



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Biochimie Appliquée

Thème :

Etude de l'activité antioxydant, antibactérienne et antifongique de l'extrait des feuilles du *Raetama sphaerocarpa* L.(Bioss).

Présenté par :

RAIS Halima

MECHERI Aicha

Devant le jury :

Mme ZEGHIB Assia

MCB

Université de Tébessa

Président

Mr. DJABRI Belgacem

Pr

Université de Tébessa

Rapporteur

Mr. GHERISSI Bilal

MAA

Université de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance:

22/06/2020

ملخص

لطالما قدمت النباتات دورًا مهمًا جدًا للبشرية ، لأنها يمكن أن انتاج عددًا كبيرًا من الجزيئات العضوية المعقدة التي غالبًا ما تكون تقوم بأنشطة بيولوجية . الهدف من هذه الدراسة هو معرفة الخصائص المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا والفطريات للمستخلص الميثانولي لأوراق *Retama spherocarpa*

تم الحصول على مستخلص الميثانولي لأوراق *Retama spherocarpa* عن طريق غمس 100g في 1000ml من الميثانول متبوعًا بتبخير هذا المذيب. و يتم الكشف عن النشاطات المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي لأوراق *retama spherocarpa* بالمقارنة مع فيتامين C باستخدام طريقة ارجاع الجذر الحر DPPH وتم تحديد التراكيز المثبطة (50) (50%) CI و تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على 03 سلالة بكتيرية (*E. coli* ، *M. luteus* و *S. aureus*) و 2 فطريات (*C. albicans* L24 و L36) بطريقة نشر القرص.

مردود استخراج هذا النبات بواسطة الميثانول في المادة الجافة ملحوظ للغاية (34.17%). تظهر نتائج النشاط المضاد للأكسدة أن القوة المضادة للأكسدة ملحوظة مقارنة بفيتامين C الذي يمثل مضادات الأكسدة المفضلة. يسمح اختبار DPPH باستنتاج أن النسبة المئوية لتثبيط الجذور الحرة لـ DPPH لفيتامين C أعلى من نسبة (62.19% EM-Rs مقابل 90.86%) في $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$. كان IC50 لمستخلص الميثانولي لأوراق *Retama spherocarpa* أعلى من فيتامين س ($688.74 \mu\text{g} / \text{ml}$ مقابل $114.31 \mu\text{g} / \text{ml}$ على التوالي). يؤكد اختبار تقليل الحديد FRAP هذه النتائج. في الواقع ، كان الامتصاص المسجل لفيتامين س $2,131\text{nm}$ ، بينما كان الامتصاص لمستخلص الميثانولي لأوراق *Retama spherocarpa* 0.855nm .

يظهر النشاط المضاد للبكتيريا أن مستخلص الميثانولي لأوراق *Retama spherocarpa* يظهر تأثيرًا كبيرًا ضد السلالات البكتيرية 03 التي تم اختبارها (*M. luteus* ، *E. coli* ، *S. aureus*) مع أقطار التثبيط ($19.67\text{mm} / 13.67\text{mm} / 19.33\text{mm}$) على التوالي. يظهر النشاط المضاد للفطريات من EM-Rs أيضًا تأثيرًا ملحوظًا في السلالات الفطرية 02 التي تم اختبارها (*C. albicans* L24 ، *albicans* L24) ، بأقطار تثبيط ($21.00\text{mm} / 18.11\text{mm}$) على التوالي

يتمتع بأنشطة بيولوجية تبرر استخدامه كبديل لبعض *Retama spherocarpa* تؤكد نتائجنا أن مستخلص الميثانولي لأوراق المواد المضادة للأكسدة ومضادات حيوية معينة

الكلمات المفتاحية: خلاصة ميتالونيك ، *Retama spherocarpa* ، نشاط مضاد للأكسدة ، أنشطة مضادة للميكروبات

Abstract

Plants have long presented a very important role for humanity, because they can synthesize a large number of complex organic molecules often endowed with potential biological activities. The purpose of our framework study was to study the antioxidant, antibacterial and antifungal effects of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves.

the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves. was obtained by maceration of 100 g in 1000 ml of methanol followed by the evaporation of this solvent. The antioxidant activity of different concentrations of methalonic extract compared to vitamin C was evaluated using the techniques of reduction trapping of the free radical DPPH and the reducing power of ferric iron (FRAP). Antibacterial activity was tested on 03 bacterial strains (*E. coli*, *M. luteus* and *S. aureus*) and 2 fungi (*C. albicans* L24 and L36) by the disc diffusion method.

the yield of the extraction of this plant by methanol in dry matter is quite remarkable (34.17%). The results of the antioxidant activity show that the antioxidant power of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves is remarkable compared to Vit C was which is the gold standar antioxidant. The DPPH test concluded that the percentage of inhibition of the free radical of DPPH for vit C is higher than that of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves (62.19% vs 90.86%) in 1000µg / ml. The IC50 of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves was higher than that of vit C (688.74 µg / ml vs 114.31 µg / ml respectively). The FRAP iron reduction test confirms these results. Indeed, the absorbance recorded for vit C was 2.131 nm and whereas that of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves was and 0.855 nm.

The antibacterial activity shows that the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* has a great effect against the 03 tested bacterial strains, (*S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*) with inhibition diameters of 19.33mm / 13.67mm / 19.67mm respectively. The antifungal activity of the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves also shows a remarkable effect in the 02 tested fungal strains (*C. albicans* L24, *C. albicans* L36), with inhibition diameters of 18.11 mm / 21.00 mm respectively.

Our results confirm that the methanolic extract of the *Retama spherocarpa* leaves is endowed with biological activities which justify its use as an alternative of certain antioxidant substances and certain antibiotics.

Keywords: methalonic, *Retama spherocarpa*, antioxidant activity, antimicrobial activities

Résumé

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Dans ce contexte, nous avons conduit cette étude qui avait pour objectif d'investiguer les effets antioxydant, antibactérien et antifongique de l'extrait méthanolique des feuilles de *Retama sphérocarpa* (EM-Rs)

L'EM-Rs a été obtenu par macération de 100g de poudre des feuilles sèches de *Retama sphaerocarpa* dans 1000 ml de méthanol pendant 72 h suivie par l'évaporation du ce solvant. L'activité antioxydante de différentes concentrations de l'EM-Rs comparée à la vitamine C a été évaluée en utilisant les techniques de réduction piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP). L'activité antibactérienne a été testée sur 03 souches bactériennes (*E. coli*, *M. luteus* et *S. aureus*) et 2 champignons (*C. albicans* L24 et L36) par la méthode de diffusion sur disque.

Le rendement de l'extraction en EM-Rs est remarquable (34,17%). Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le pouvoir antioxydant de l'EM-Rs est assez acceptable comparé à la Vit C qui représente l'antioxydant de choix. Le test de DPPH a permis de conclure que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour une concentration de 1000 μ g/ml était de 62,19% pour l'EM-Rs alors que celui de la vit C était de 90,86%. La CI_{50} de l'EM-Rs était supérieure à celle du vit C (688,74 μ g/ml vs 114,31 μ g/ml respectivement). Le test de réduction du fer (FRAP) confirme ces résultats. En effet, l'absorbance enregistré pour la vit C était de 2,131 nm et alors que celle de l'EM-Rs était de et de 0,855 nm.

L'étude de l'activité antibactérienne montre que l'EM-Rs manifeste un grand effet contre les 03 souches bactériennes testées avec des diamètres d'inhibition de 13,67mm, 19,33mm et 19,67mm respectivement pour *E. coli*, *S. aureus* et *M. luteus*. L'activité antifongique de l'EM-Rs manifeste également un effet remarquable chez *C. albicans* L24 et *C. albicans* L36 avec des diamètres d'inhibition de 18,11mm et 21,00mm respectivement.

Nos résultats confirment que l'EM-Rs est doué d'activités biologiques qui justifient son éventuelle utilisation en alternative à certaines substances antioxydante et certains antibiotiques.

Mots clés : extrait methalonique, *Retama sphérocarpa*, activité antioxydante, activités antimicrobiennes

Dédicaces

Je dédie ce travail à celui qui m'a appris combien la patience est la clé du succès, à celui dont l'âme m'accompagne partout où je vais à ceux qui me manquent face aux difficultés, et le monde ne lui a pas permis d'étancher sa tendresse à qui je porte son nom avec fierté, mon cher père

À mon paradis dans ce monde, mon soutien dans la vie À ceux qui ont beaucoup sacrifié pour moi ont porté mes inquiétudes et m'ont inondé de prières pour ce que, si je les décrivais, ma mère ne lui ferait pas justice, puis ma mère et puis ma mère.

À celui qui s'est fait un mur sur lequel s'appuyer alors que je ne trouvais personne à côté de moi à celui qui faisait confiance à mon succès et me considérait comme une amie, sœur et fille de mon «cher oncle».

À ceux d'entre eux, levez la tête avec fierté, aux bougies brillantes qui illuminent les ténèbres de ma vie, à ceux avec leur présence et leur amour, gagnez en force et savourez le goût de la vie avec le plaisir de ma petite fille "blkis" et de ma jumelle "dalila" qui partagent avec moi jusqu'à mon souffle.

Pour la sécurité, la chaleur et la tendresse à la gentillesse envers quiconque le lien de fraternité et de sang me lie «à toute ma famille et mes proches».

A mon sanctuaire et mon refuge à mon lien après ma famille et mon aide, après mon Seigneur, à qui j'ai goûté les plus beaux moments avec elle, à mon amie et sœur "djamila".

Vous m'avez aidé à chaque instant à celui qui a expulsé la peur qui était en moi, à celui qui m'a motivé, "Hanan".

À tous les professeurs qui nous ont enseignés et qui par leurs compétences nous ont soutenus dans la poursuite de nos études surtout . **Dr. MSAADIA Amira** et **Dr. ZEGHIB Assia** et **Professeur DJABRI Belgacem** vo conseil on été le flame qui m'a motivé toutes ces années.

Dédicace

Je dédie ce travail à celui qui m'a appris combien la patience est la clé du succès, à celui dont l'âme m'accompagne partout où je vais à ceux qui me manquent face aux difficultés, et le monde ne lui a pas permis d'étancher sa tendresse à qui je porte son nom avec fierté, mon cher père

A mon père pour son soutien et son amour, à ma mère, je dédie ma vie toute entière car sans toi je n'aurais été ce que je suis aujourd'hui.

À tous les professeurs qui nous ont enseignés et qui par leurs compétences nous ont soutenus dans la poursuite de nos études surtout . **Dr. MSAADIA Amira et Dr. ZEGHIB Assia et Professeur DJABRI Belgacem** vo conseil on été le flame qui m'a motivé toutes ces années.

Et surtout a ma petite amie Halima qui m'a toujours soutenue.

Aicha

Remerciements

Avant tout, je remercie DIEU qui ma donnée le courage et la volonté.

Professeur DJABRI Belgacem, nous vous remercions pour vos conseils, vos encouragements et vos conseils, tout en nous laissant une grande indépendance. Nous n'oublions pas tous les efforts consentis pour pouvoir terminer ce travail dans de bonnes conditions.

Dr. GHERISSI Bilal et Dr. ZEGHIB Assia, Nous tenons à vous remercier chaleureusement pour le grand honneur que vous nous avez accordé en acceptant de présider ce comité. Nous sommes tellement impressionnés par vos grandes qualités humaines que seules vos compétences élevées sont à la hauteur.

Nous souhaitons aussi adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire spécialement : **Dr. belhej**

Nous remercions tous les enseignants qui nous ont fait profiter de leur savoir, tout au long de nos études et surtout le responsable du parcours **M^m.Ameri**, le personnel administratif, du Département de Biologie Appliquée : **Souad** et le technicien du laboratoire des Sciences de **Tahar Hacéne** pour leurs aides.

Enfin, nos remerciements vont à tous ceux qui ont collaboré à l'achèvement de ce travail.

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
Tableau 1	Les espèces réactives de l'Oxygène	05
Tableau 02	Les principaux antibiotiques et leur classification selon leur nature biochimique.	15
Tableau 03	Classification simplifiée des champignons	19
Tableau 04	Récapitulatif de la répartition géographique du genre <i>Rétama</i> dans le monde selon.	28
Tableau 05	Composés contenus dans l'extrait méthanolique de <i>Retama sphaerocarpa</i> . (A) pourcentages des composés , Structures chimiques de quelques composés.	37
Tableau 06	noms chimiques de quelques alcaloïdes isolés de <i>R.monosperma</i> , <i>R. raetam</i> , <i>R. sphaerocarpa</i> .	38
Tableau 07	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.	42
Tableau 08	Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH.	44
Tableau 09	Liste d'appareils et réactifs utilisé dans le test du FRAP	45
Tableau 10	Matériels et produit utilisés	46
Tableau 11	Souches bactériennes et fongique utilisées.	47
Tableau 12	Protocole de préparations des Milieux de culture utilisées.	48
Tableau 13	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre du halo d'inhibition.	50
Tableau 14	Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) d'extrait méthanolique des feuilles de <i>Retama Sphaerocarpa</i> contre certaines souches microbiennes.	56

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
Figure 01	Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique).	04
Figure 02	Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale.	07
Figure 03	Sites de production intracellulaire des RL.	08
Figure 04	Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène	09
Figure 05	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.	10
Figure 06	comparaisons des enveloppes des bactéries Gram+ et Gram –.	13
Figure 07	différents mécanismes de résistance des bactéries	18
Figure 08	Cibles des différents antifongiques.	21
Figure 09	a. <i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb, b. <i>Retama monosperma</i> (L.) Boiss, c. <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boiss	25
Figure 10	L'espèce <i>Retama monosperme</i> (fleur, arbre).	25
Figure 11	L'espèce <i>Retama Raetam</i> .	26
Figure 12	Plante de <i>Retama sphaerocarpa</i> .	26
Figure 13	Arbre phylogénique de <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boisse .	27
Figure 14	Distribution géographique de trois espèces de <i>Retama</i> en Algérie .	28
Figure 15	Classification des polyphénols.	34
Figure 16	Région de récolte de la plante (SERDIES, Tébessa).	41
Figure 17	Plante étudiée: <i>Retama sphaerocarpa</i> .	42
Figure 18	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).	43
Figure 19	méthode de diffusion sur disque (milieu gélosé).	47
Figure 20	a: suspension bactérienne préparer.b: ensemencement.	49
Figure 21	application d'EM-Rs sur les disques.	50
Figure 22	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de <i>Raetama sphaerocarpa</i> et vit.C.	52
Figure 23	Détermination de la valeur IC50 de la vitamine C (A) et de l'extrait de <i>Raetama sphaerocarpa</i> (B).	53
Figure 24	Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et extrait de <i>Raetama sphaerocarpa</i> avec le temps	55
Figure 25	Résultat des tests antibactériens de l'EM-Rs vis-à-vis des bactéries: <i>S. aureus</i> . (A) et <i>E. coli</i> (B)	57
Figure 26	Résultat des tests antifongiques de l'EM-Rs vis-à-vis des levures: <i>Candida albicans</i> L24 /L36.	59

Liste des abréviations et symboles

°C: degree Celsius

5-FC : 5-fluorocytosine

5-FU : 5-fluorouracile

ADN : Acide désoxyribonucléiques.

AG : acide gras

AGPI : des acides gras polyinsaturés

AmB : amphotéricine

AmpC: adenosine monophosphate cyclique

AOH: Le polyphénol

ASC: L'acide L-ascorbique

ATP: Adénosine triphosphate

BLSE: β -lactamases Spectre Etendue

C.albicans: Candida albicans

Car: caroténoïdes

CAT: La catalase

CI50: Concentration inhibitrice 50%

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CO: Monoxyde de carbone

Cu: Cuivre

Cu/Zn-SOD: Cuivre-Zinc Superoxyde

Cu⁺ : ions cuivreux

D- ala: D-alanine

DHA: l'acide déhydroascorbique

DPPH: 2.2 diphényl-1 picryl hydrazyl.

E.coli: Escherichia coli

ERG: ergostérol

ERO: espèces réactives de l'oxygène

EVR: Enterococcus résistants aux glycopeptides

F.zol: flazole

Fe: le fer

Fe²⁺: ions ferreux

Fe³⁺: ions ferriques

F-pyrimidines: fluoropyrimidines

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

GGPP: géranylgeranyl pyrophosphate

GPP: géranyl pyrophosphate

GPX: La glutathion peroxydase

Gpxs: Glutathion peroxydases

Grx: Les glutaredoxines

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydé

H⁺: proton

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HCl: acide chlorhydrique

HOCl: Acide hypochloreux

I%: pourcentage d'inhibition

k.p: entérobactéries productrice de carbapénémase

KOH : hydroxyde de potassium

LPS: lipopolysaccharide

M: molarité

MB: concentration minimale bactéricide

MDA: malondialdéhyde

MDHA: l'acide monodéhydroascorbique

Mg: Magnésium

mg: milligramme

MPO: La myélopéroxydase

NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NO: Oxyde d'azote

NO°: Oxyde nitrique

NO₂: Dioxyde d'azote

NO°: Monoxyde d'azote.

NOS: l'oxyde nitrique synthase

NQO1: quinone oxydoréductase 1

O₂⁻: Radical superoxyde.

O₂^o: Anion superoxyde.

OH°: Radical hydroxyle.

OMP-A: outer membrane protein A precursor

ONOO: Peroxynitrite.

Oo.myC: Les Oomycètes

P.: paroi

PBP 2a: penicillin protein 2A

PDI: protéine disulfure isomérase

PG: peptidoglycane

Prx: Les peroxyredoxines

R: un acide gras polyinsaturé

RE: Le réticulum endoplasmique

RL: radical libre

RO₂^o: Radical peroxyde

ROH: alcool

ROOH: Peroxydes.

SAMR: Staphylococcus aureus méticilline Résistant

Se: le sélénium

SODs: Super oxydes dismutases.

T.peptide: tetrapeptide

UPR: Unfolded Protein Response

Vit: vitamine

Vit C: Vitamine C.

Zn: le zinc

β-lactamines: beta-lactamines

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicaces

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations et symboles

Table des matières

Introduction	01
I. Parti bibliographie	04
I.1. Activités biologiques	04
I.1.1. Activité antioxydante	04
I.1.1.1. Stress oxydant	04
I.1.1.2. Radicaux libres	04
I.1.1.3. Sources cellulaires des radicaux libres.	07
I.1.1.4. Cibles et conséquences des radicaux libres	09
I.1.1.5. Antioxydants.	09
I.1.1.6. Différents types et sources d'antioxydants	10
I.1.2. Bactéries et antibiotiques	12
I.1.2.1. Introduction	12
I.1.2.2. Structure des bactéries	13
I.1.2.3. Antibiotiques	14
I.1.3. Champignons et Antifongiques	18
I.1.3.1. Généralité sur les champignons	18
I.1.3.2. Classification des champignons	19
I.1.3.3. Antifongiques	19
I.1.3.4. Rôle des plantes médicinales dans la lutte contre les champignons	22
I.2. Généralité sur la plante de <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boiss	24
I.2.1. Généralité sur les plantes médicinales	24
I.2.2. Famille des Fabacées	24
I.2.3. Présentation des espèces	25
I.2.3.1. Morphologie générale	25
I.2.4. Nom Vernaculaire de L'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boiss. .	26
I.2.5. Systématique	27
I.2.6. Distribution géographique du genre <i>Rétama</i>, en Algérie et dans le monde	27
I.2.7. Importance du genre <i>Rétama</i>	29
I.2.7.1. Importances en médecine traditionnelle	29
I.2.7.2. Importances écologiques	29
I.2.7.3. Importance médicinale et pharmaceutique du genre <i>Rétama</i>	30

I.2.7.4. Importance industrielle et économique	31
I.3. Extraits de Rétama et leurs utilisations	33
I.3.1. Généralité sur les extraits des plantes	33
I.3.1.1. Phytochimie	33
I.3.1.2. Définition des Principes actifs	33
I.3.1.3. Différents groupes des Principes actifs	33
I.3.2. Copositions des extraits des plantes	33
I.3.2.1. Polyphénols	33
I.3.2.2. Terpènes	35
I.3.2.3. Alcaloïdes	35
I.3.3. Utilisations des extraits des plantes	35
I.3.4. Extraits des <i>Retama</i> et Substances Naturelles	36
I.3.4.1. Technique d'analyses des extraits de l'espèce <i>Retama sphaerocarpa</i>	36
I.3.4.2. Extraits des <i>Retamas</i>	36
I.3.5. Activités biologiques des extraits des retamas	38
II. matériels et méthodes	41
II.1. Obtention de l'extrait méthanolique	41
II.1.1. Matériel végétal	41
II.1.2. Matériel d'extraction	42
II.1.3. Procédé d'extraction	42
II.1.4. Calcul du rendement d'extrait	42
II.2. Evaluation de l'activité antioxydante	43
II.2.1. Test d'activité DPPH	43
II.2.1.1. Matériel et réactif	44
II.2.1.2. Mode opératoire	44
II.2.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC50%	45
II.2.2. Test de la réduction du fer (FRAP)	45
II.2.2.1. Matériels et réactifs	45
II.2.2.2. Mode opératoire	45
II.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne	46
II.3.1. Matériels et produits	46
II.3.2. mode opératoire	47
II.3.2.1. Souches testées	47
II.3.3. Protocole expérimental	47
II.3.3.1. Milieu de culture	48
II.3.3.2. Préparation des boîtes de pétri	48
II.3.3.3. Préparation des suspensions	48
II.3.3.4. Ensemencement	49
II.3.3.5. Préparation des disques et l'ajoute d'EM-Rs	49
II.3.3.6. Incubation	50
II.3.3.7. Lectures	50
III. Résultat et discussion	52
III.1. Rendement de l'extrait de méthanolique <i>Retama sphaerocarpa</i>	52
III.2. Activité antioxydante de l'extrait de <i>Raetama sphaerocarpa</i>	52

III.2.1. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH	52
III.2.2. Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%)	53
III.2.3. Etude cinétique de la réaction par le test de réduction du fer (FRAP)	54
III.3. Activité antimicrobienne de EM-RS	56
III.3.1. Activité antibactérienne d'EM-Rs	57
III.3.2. Activités antifongiques d'EM-Rs	59
Conclusion	62
Liste des références bibliographiques	64

Introduction

Introduction

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique (**Hurtel, 2006**).

Les *Retames* sont des légumineuses arbustives, à été répertorié comme étant plante médicinale possédant à la fois des intérêts pharmacologiques et écologiques. Le genre *sphérocarpa* a fait l'objet de plusieurs travaux en ce qui concerne les activités biologiques (**UNESCO, 1960**). En médecine traditionnelle, *Rétama sphérocarpa* est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies comme morsures de serpents et l'eczéma (**EL Hamrouni, 2001**). Le pouvoir pharmacologique des *Retames sphérocarpa* est dû à la présence de certains Alcaloïdes, en plus *Retama sphérocarpa* à une activité antioxydant ainsi qu'antimicrobienne et cytotoxique. (**Maghreni et al., 2005**).

Les espèces réactives oxygénées et azotées (ERO/ERN) sont produites en continu dans le corps humain et elles sont contrôlées par les enzymes endogènes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, la catalase). Quand il y'a une surproduction de ces espèces, suite à une exposition à des substances oxydantes externes ou un déséquilibre dans les mécanismes de défense, des dommages aux biomolécules majeures (ADN, acides aminés, lipides, protéines) peuvent survenir, ce qui donne lieu au stress oxydatif qui est impliqué dans diverses pathologie à savoir le cancer, le diabète, le vieillissement et plusieurs autres maladies (**Aruoma,1998**). D'autre part, les végétaux jouent un rôle très important dans l'apport en antioxydants exogènes qui vont venir soutenir l'effet des antioxydants endogènes. On y retrouve notamment les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes, stilbènes), les vitamines (vitamine E, vitamine C et vitamine A) ainsi que les oligoéléments (cuivre, manganèse, sélénium et zinc). (**Louaar et al., 2005**)

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (**Boudjouref, 2011**). De plus, au cours de ces dernières années, les médicaments à base de plantes sont devenus de plus en plus populaire dans certaines régions du monde, alors que dans d'autres parties, il a toujours été un élément essentiel dans le système de santé (**Djeddi et al., 2015**).

Bien qu'on dispose aujourd'hui de médicaments antifongiques, le traitement des mycoses

reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes réellement efficaces et de leur coût très élevé, et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques usuels. Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances fongitoxiques pouvant être l'ébauche d'enrichir l'arsenal thérapeutique actuel (**Dzoyem, 2010 ; Rex et al., 1995**)

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des activités biologiques de l'extrait des feuilles du *Raetama sphaerocarpa* en évaluant *in vitro* les activités antioxydantes. Ainsi, que l'étude des activités antimicrobiennes

Le présent travail sera organisé autour d'un plan comportant les grandes parties suivantes :

- Une première partie consacrée à la revue bibliographique
- Une deuxième partie qui va concerner le matériel et les méthodes utilisés, résultats et leur discussio.

Activités biologiques

I. Parti bibliographie

I.1. Activités biologiques

I.1.1. Activité antioxydante

I.1.1.1. Stress oxydant

Selon Wiseman et Halliwell (1996) ; Peltier *et al.* (2004) ; Bloomer et Fisher-Wellman (2008) ; Browne *et al.* (2008) ; Powers *et al.* (2010) ; Roede et Jones (2010), le stress oxydant est d'un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants (Figure 01). Il y a des accumulations à la suite d'une production excessive des radicaux libres qui peuvent être neutralisées par les systèmes antioxydants. Dans le cas normal avec une faible concentration d'espèces réactives, le déséquilibre est de courte durée qui sera suivi par un rééquilibrage (Delattre *et al.* 2007). Des altérations intracellulaires peuvent-être générés comme l'oxydation de l'ADN, des lipides et des protéines (Davies, 2004).

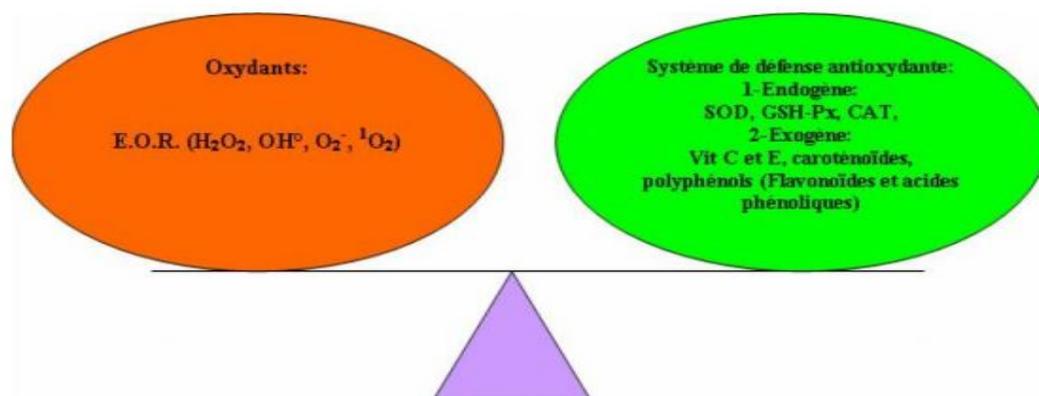


Figure 01 : Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique) (Prior et Gu, 2005)

I.1.1.2. Radicaux libres

Un radical libre (RL) est une substance chimique qui possède un électron non apparié sur son orbitale externe ce qui leur confère une haute réactivité et une instabilité. Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et les arrachent donc à d'autres molécules pour atteindre la stabilité. Ce phénomène correspond une oxydation des molécules donneuses d'électron (Cossu *et al.* 1997 ; Gilgun-Sherki *et al.* 2001).

Selon Migdal *et al.* (2011), les RL se divisent en deux familles : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN).

a) Espèces réactives à l'oxygène

Les ERO sont les radicaux les plus abondants et la cause majeure du stress oxydatif, regroupe dans des radicaux qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron et sont plus réactives que l'oxygène où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnel (Fang *et al.*, 2002 ; Favier, 2006 ; Mac Laren, 2007 ; Valko *et al.*, 2007).

Les ERO sont soit des espèces actives radicalaires de l'oxygène, soit des espèces actives non radicalaires de l'oxygène (tableau 1). Les premières dérivent de l'oxygène par des réductions mono électroniques, alors que les dernières dérivent de l'oxygène et peuvent être des précurseurs de radicaux (Noguchi, 2002 ; Krieger-Liszkay, 2005).

Tableau 1 : Les espèces réactives de l'Oxygène (Migdal, 2011).

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	HO^{\cdot}	$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO^{\cdot} + HO^- + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + HO^{\cdot} + HO^-$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2 GSH \longrightarrow 2 H_2O + GSSG$
Radical Peroxyle	RO_2^{\cdot}	$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$
Hydroperoxyde	RO_2H	$RO_2^{\cdot} + RH \longrightarrow RO_2H + R^{\cdot}$

- **Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$**

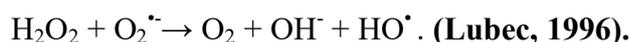
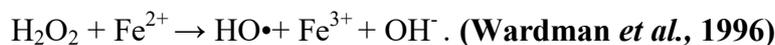
L'anion superoxyde est le premier ERO (Mandelker, 2008) produit par la réduction mono électrique d'une molécule de dioxygène (Gardès-Albert *et al.*, 2005 ; Hennebelle, 2006 ; Mandelker, 2008). Cet électron provient d'une fuite au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et par La NADPH oxydase se trouve dans la membrane plasmique ainsi que dans la membrane du phagosome (Lambert *et al.*, 2009). Sa demi-vie longue comparée aux autres EOR et il peut diffuser loin de son lieu de production. Il réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical hydroxyle (Mandelker, 2008).

- **Peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le peroxyde d'hydrogène ne rentre pas dans la définition stricte du radical car tous ses électrons périphériques sont appariés. (Barouki, 2006), mais Il est relativement stable. possède une demi-vie longue, diffuser très facilement à travers les membranes, il est peu dangereux, et constitue la source du radical hydroxyle HO^{\cdot} (Wardman *et al.*, 1996 ; Mandelker, 2008). Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ sous l'action d'une enzyme : la superoxyde dismutase (Mandelker, 2008).

- **Radical hydroxyle HO•**

Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif (Lubec, 1996), car il possède un potentiel oxydant très élevé. et une demi-vie courte, il diffuse peu donc il agit directement sur le site de production. Il est à l'origine de la formation des radicaux peroxy. (Powers et Jackson, 2008). Il peut se former par réaction de Fenton, ou par réaction de Haber-Weiss (Lubec, 1996).



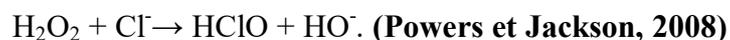
- **Radical peroxy RO₂•**

Le radical peroxy est un radical très réactif, impliqué notamment dans la propagation de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (McMichael, 2007 ; Powers et Jackson, 2008). Il peut se former par deux réactions, la première réaction correspond à la formation de R• à partir de RH (R correspond à un acide gras polyinsaturé) et la seconde réaction correspond à la formation ROO• de a partir de O₂ (Gardès-Albert et al., 2005 ; McMichael, 2007 ; Powers et Jackson, 2008).



- **Acide hypochloreux HOCl.**

L'acide hypochloreux HOCl est un agent chlorant et un oxydant fort. Ce n'est pas un radical libre à proprement parler comme le peroxyde d'hydrogène (DebyDupont et al., 1999). Il diffuse facilement les membranes biologiques. Il former essentiellement par les myeloperoxydases (MPO) leucocytaires à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ion chlorure (Powers et Jackson, 2008).



b) Espèces réactives de l'azote.

Selon Rao (2004), il s'agit du monoxyde d'azote et du peroxyde d'azote.

- **Oxyde nitrique NO•.**

Selon Rao (2004) ; Blanc et al. (2005), l'oxyde nitrique NO• est un gaz facile a diffusé les membranes avec une réactivité limitée et une demi-vie très courte. Il est formé par l'enzyme de l'oxyde nitrique synthase (NOS) à partir d'O₂ et d'un acide aminé, la L_arginine.

- **Peroxynitrite : NO_3^-**

Le peroxynitrite: NO_3^- il est formé très rapide à partir de l'anion superoxyde (O_2°) et le NO° (Powers et Jackson, 2008).



I.1.1.3. Sources cellulaires des radicaux libres.

On distingue deux types de sources des radicaux libres

a) Sources endogènes

- **Mitochondrie**

La mitochondrie constitue la principale source des ERO dans l'organisme (Young, 2002). Les ERO déroule dans des conditions respiratoires normales, on estime entre 1 et 4 % la quantité de dioxygène qui subit une réduction mono électrique au lieu de contribuer à la réduction complète du dioxygène en eau (Valko *et al.*, 2007). Les fuites se produisent essentiellement au niveau des enzymes du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale(figure 02) (Migdal *et al.*, 2011). Les Complexes I (NADH déshydrogénase) et III (cytochrome bc1) de la chaîne de transport d'électrons (ETC) mitochondrial (Young, 2002). Un à cinq pourcent (1 à 5%) d' O_2 mitochondriale peut former l' H_2O_2 et OH^\bullet (Møller, 2001). La peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la membrane mitochondriale est initiée par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par les ERO. (Rhoads *et al.*, 2006).

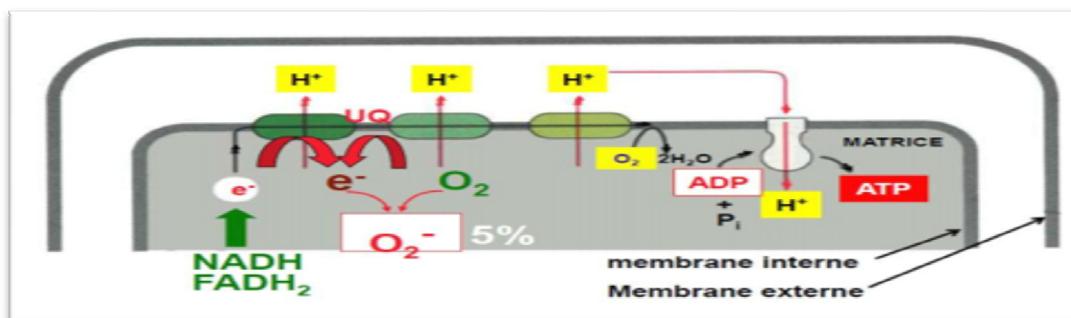


Figure 02 : Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Alberts *et al.*, 2009).

- **Peroxisome**

Les peroxysomes est une source importante des ERO intracellulaires est un organe spécialisé dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. H_2O_2 . (Zhang, 2007). Ils produisent l' O_2° suite à des métabolismes normaux. Les principaux processus responsables sont la, la α -oxydation des acides gras, et la dismutation des radicaux O_2° . Le radical NO^\bullet est également produit par la dégradation des acides aminés produits (Hu, 2007).

Synthèse bibliographique

- **Le réticulum endoplasmique (RE) lisse.**

Le réticulum endoplasmique (RE) lisse est un organite de détoxification, possède des enzymes qui catalysent une série de réactions comme le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, qui peut former des ERO. De plus de fonction de détoxification il a un rôle de la correction des protéines mal repliées qui dépendant du calcium, par les médiateurs de UPR (Unfolded Protein Response) cette fonction peut générer des ERO. (Deniaud *et al.*, 2008).

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des oxydants. Les oxydases (NADPH oxydase) sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent $O_2^{\bullet-}$ en utilisant NADH ou NADPH comme substrat. La NOS produit l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) (Sertejn *et al.*, 2002). La myéloperoxydase (MPO) produit HOCl qui amplifie la production des ERO. D'autres enzymes sont également sources de génération des radicaux libres tel que, les déshydrogénases, oxygénases et les lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase (Sertejn *et al.*, 2003).

b) Sources exogènes

Des facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent générer des radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes). De façon directe ou indirecte. Aussi l'exposition prolongée au soleil, et les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , O_2 et H_2O_2 . L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels), ainsi qu'une alimentation « chimique » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres qu'une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) ou encore les situations cliniques (figure 03) (Martinez-Cayuela, 1995 ; Chen *et al.*, 2012).

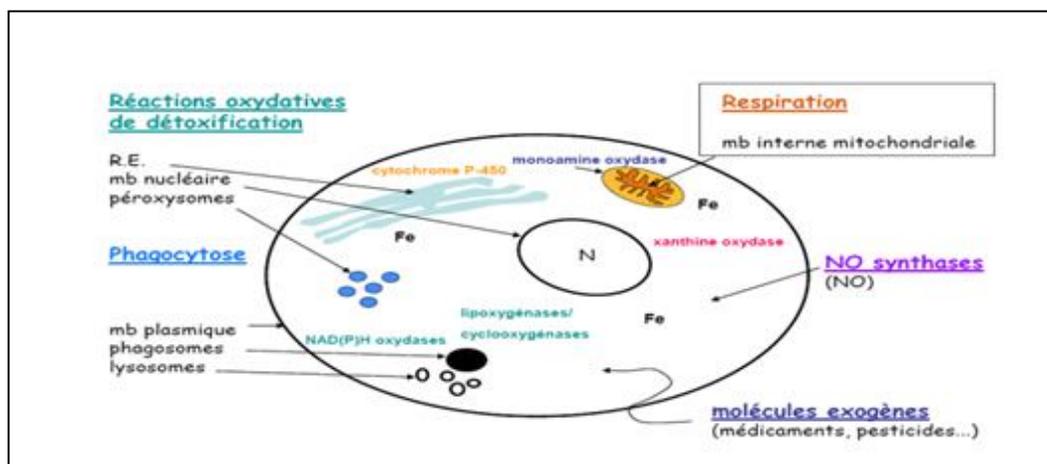


Figure03 : Sites de production intracellulaire des RL (Sertejn *et al.*, 2003)

I.1.1.4. Cibles et conséquences des radicaux libres

Les ERO peuvent induire des altérations comme la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et les mutations de l'ADN (Garg et Manchanda, 2009).

a- Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides trouvées dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Pamplona *et al.*, 2000 ; Hulbertl, 2005). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui induisent une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004).

b- Oxydation des protéines

Les protéines sont peut d'être oxydées par les ERO (Levine, 2002). Ceci conduit à une dénaturation des protéines par altération des groupements thiols et formation de ponts disulfures (Grandjean, 2005).

c- Dommages de l'ADN

L'ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles des ERO. Le radical hydroxyle (HO^\cdot), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation (figure 04) (Grandjean, 2005).

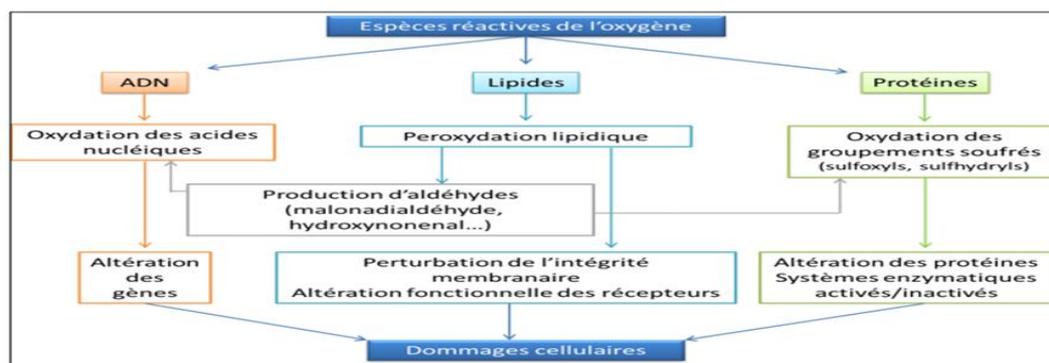


Figure 04 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène

(d'après Monteil 2004)

I.1.1.5. Antioxydants.

Compte tenu de la toxicité des ERO, l'organisme dispose de plusieurs systèmes de défense antioxydants (figure 05). Un antioxydant correspond à une substance capable, à concentration relativement faible, de retarder ou empêcher l'oxydation des substances c-a-d empêcher la formation de radicaux libres. (Halliwell *et al.*, 1990 ; Zielinski et Portner, 2000 ; Mates *et al.*,

1999 ; Comhair, 2002).

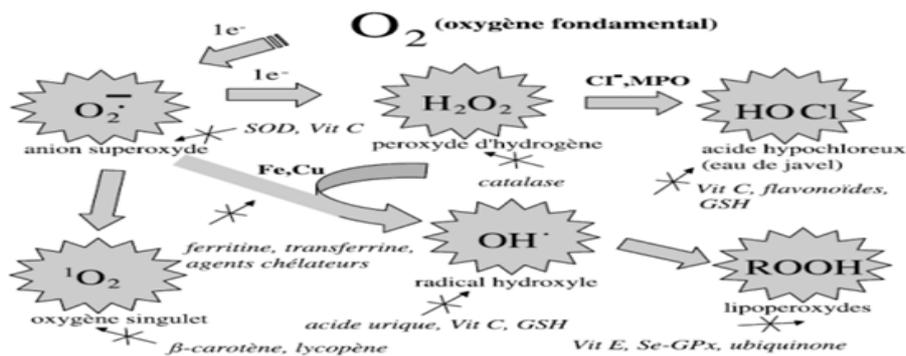


Figure 05 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer, 2008).

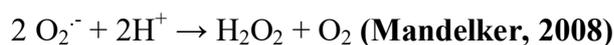
I.1.1.6. Différents types et sources d'antioxydants

a) Antioxydants endogènes

- **Antioxydants endogènes enzymatiques**

- **La superoxyde dismutase**

La superoxyde dismutase ou SOD est une métallo-enzyme se retrouvant dans tous les organismes aérobies. Elle est la première enzyme antioxydante de défense contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002).



Selon Valko *et al.* (2007), elles sont à l'origine de la production de H_2O_2 . Elles permettent surtout de diminuer la durée d'existence de l'anion superoxyde donc d'empêcher la formation d'espèces beaucoup plus néfastes comme le peroxyde d'azote. Il existe trois isoformes de la SOD : Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD (Fridovich, 1997).

- **La catalase**

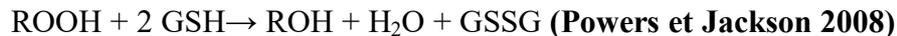
Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. Elle catalyse la dismutation de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire, pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges.



- **La Glutathion Peroxydase**

La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH respectivement en eau et alcool ROH. (Meister et Anderson,

1983). Il existe plusieurs isoformes de GPx (Mates, 1999 ; Comhair, 2002)



- Glutathion réductase

Selon Powers et Jackson (2008), la glutathion réductase (GR), elle régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons.



- **Antioxydants endogènes non enzymatiques**
- **Glutathion**

Le glutathion (L-γ-glutamyl-L-cystéinyglycine) est un tripeptide, avec un groupement thiol. (Noctor et Foyer, 1998 ; Yadav *et al.*, 2010 ; Anjum *et al.*, 2012). Chez les plantes, le glutathion impliqué dans une multitude de processus cellulaires, y compris la défense contre les ROS (Foyer et Noctor, 2005 ; Mullineaux et Rausch, 2005). Le glutathion (GSH) est considéré comme un biomarqueur du stress oxydatif (Anjum *et al.*, 2012). Selon Koivula et Eeva (2010), il y a deux formes de le glutation ; La forme réduite (GSH) est un tripeptide stable, à fort pouvoir réducteur et la forme oxydée (GSSG) est le glutathion disulfide.

- Acide urique

Selon Pritchard *et al.* (1993), l'acide urique issu du catabolisme des purines. Il il réduit les radicaux peroxydes, hydroxydes et neutralise aussi l'anion superoxyde (Ames *et al.*, 1981 ; Simic *et al.*, 1989).

- Coenzyme Q

Le coenzyme Q est un composé hydrophobe qui se situe dans les membranes cellulaires. Il appartient à la chaîne de respiration mitochondriale. Il est présent dans les lipoprotéines où il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes. Son effet anti-oxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme Q est le seul anti-oxydant liposoluble endogène (Bentinger *et al.*, 2010).

b) Antioxydants exogènes

- **Vitamine C**

L'acide L-ascorbique ou vitamine C (ASC) est un antioxydant trouver dans les plantes. Contrairement aux cellules animales, (Foyer *et al.*, 1994). Il peut neutraliser les radicaux O₂·- , OH· et les hydroperoxydes produits par la peroxydation lipidique (Esposito *et al.*, 2002 ; Fang *et al.*,

2002 ; Favier, 2006).

- **Vitamine E**

L' α -tocopherol ou vitamine E est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques (Esposito *et al.*, 2002 ; Fang *et al.*, 2002; Favier 2006). Ils sont des antioxydants majeurs qui protègent les membranes en piégeant les radicaux libres, tels que l' 1O_2 , et en bloquant la propagation de la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis *et al.*, 2003 ; Lyn Patrick, 2006).

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes (Car) sont des pigments issus des plantes et microorganismes (Valko *et al.*, 2006). L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^{\bullet} , HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, R^{\bullet} par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent aussi de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2006).

- **Oligoéléments**

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes ont besoin d'un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. (Krinsky, 1989).

- **Polyphénols et flavonoïdes**

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des composés retrouvés dans les plantes. Ils possèdent des propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Jacques *et al.*, 1995).

I.1.2. Bactéries et antibiotiques

I.1.2.1. Introduction

L'organisme humain, est constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons). Il possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave. (Dedet, 2007)

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux

Synthèse bibliographique

épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. (Hallel, 2011).

I.1.2.2. Structure des bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autres organites dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. A l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi. (Hart et Shears, 1999) Dans une cellule bactérienne, on peut distinguer des éléments constants, trouvés chez toutes les espèces bactériennes et des éléments inconstants présents chez certaines espèces seulement. (Pilly, 2014).

- **Notion Gram+/Gram-**

Paroi des bactéries à Gram positif : Elle est homogène, épaisse, et comporte le PG (90% de la paroi) lié aux acides teichoïques qui sont des unités répétées sucre (Guindo, 2008), et aux acides lipoteichoïques. Paroi des bactéries à Gram négatif : Elle a une structure complexe, elle est plus fine que celle des Gram (+) (Singleton, 2005), elle constituée d'une fine couche de PG et une couche externe de la paroi dite membrane Externe est essentiellement une bicouche lipidique liée à des macromolécules rejetées vers l'extérieur appelées lipopolysaccharide (LPS) (Davies J et Davies D., 2010). Sur le plan physiopathologique, le LPS, extrêmement toxique, représente l'endotoxine des bactéries à Gram négatif (Davies et Davies, 2010) On retrouve ces différences sur la figure ci-dessous.(Figure 06)

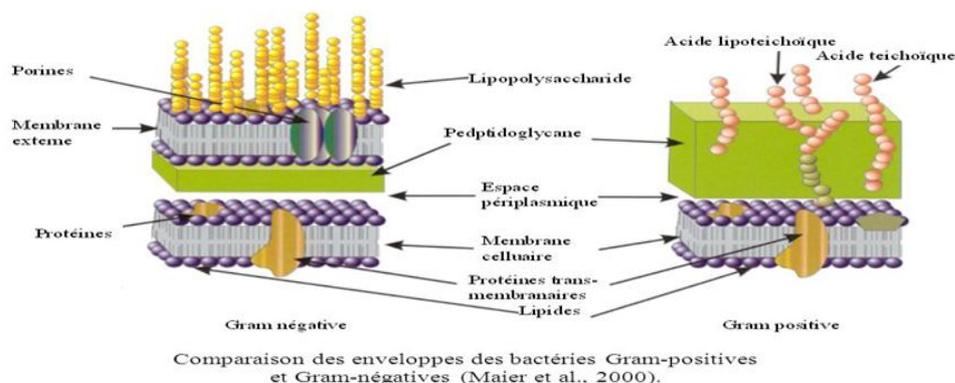


Figure 06 : comparaisons des enveloppes des bactérie gram+ et gram –

(Maie et al., 2000)

I.1.2.3. Antibiotiques

a- Définition des antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gogny et al., 2001**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Ogwara, 1981**).

b- Effet des Antibiotique

Les antibiotiques exercent un effet bactéricide, ou bien à un effet bactériostatique. C'est la notion du bactériostase. Qui consiste en un ralentissement de la croissance bactérienne pouvant aller jusqu'à une absence de croissance. Donc c'est le pouvoir de destruction d'une partie de la souche bactériennes.

- **Effet bactériostatique**

D'un antibiotique sur la population d'une souche bactérienne est indiqué par la détermination de la mesure de la CMI (concentration minimale inhibitrice). Cette CMI entraîne un ralentissement de la croissance de la population bactérienne tel qu'il atteint une absence de croissance. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu et à des conditions parfaitement définis (après 18 heures à 37 °C), toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée (**Archambaud, 2009**) (**Soilleux, 2008**)

- **Effet bactéricide**

D'un antibiotique sur une souche bactérienne est indiqué par la détermination de la mesure de la CMB (concentration minimale bactéricide), il est définie comme la plus faible concentration de cet antibiotique permettant une réduction du nombre de survivants de la population de cette souche au moins égale à 10^{-4} bactéries/ml d'un inoculum de 10^6 bactéries/ml (soit 100 survivants/ml sur 1.000.000 bactéries ensemencées/ml c'est-à-dire 1 survivant sur 10.000 bactéries de l'inoculum) Après 18h de culture à 37°C de cette souche en présence de l'antibiotique (**Archambaud, 2009 et Soilleux, 2008**).

Un antibiotique est bactéricide si la CMI est égale à la CMB. Il sera bactériostatique dans le cas où la CMI est très inférieure à la CMB. On parlera d'antibiotique tolérant pour un antibiotique dont le rapport CMB / CMI donnera un résultat très supérieur à 32 (**Soilleux, 2008**). D'autre auteur ont fait des classifications plus ou moins différents comme : **Marmonier 1990** dit que le CMB/ CMI

Synthèse bibliographique

≤ 4 (Effet bactéricide) et $CMB/ CMI > 4$ (effet bactériostatique), par contre **Olivier 2007** dit que le $CMB/ CMI \leq 2$ (Effet bactéricide) et $CMB/ CMI > 2$ (effet bactériostatique)

c- Classification des antibiotiques

A l'heure actuelle, les antibiotiques sont regroupés selon leur nature chimique. Très variable, elle est basée souvent sur une structure de base. Le tableau ci-après présente les grandes classes d'antibiotiques avec les dénominations les plus usuelles (**Auckenthaler, 1995 et Joffin, 2001**) (tableau 02)

Tableau 02: Les principaux antibiotiques et leur classification selon leur nature biochimique (**Joffin, 2001**).

Classe d'antibiotique	Exemples	
Aminosides	Streptomycine, kanamycine, Gentamycine, Tobramycine, Amikacine	
Molécules actives seulement sur les mycobactéries tuberculeuses	Amphotéricine B, Fluorcytosine, Kétoconazole	
Antifongiques	Amphotéricine B, Fluorcytosine, Kétoconazole	
Bétalactamines	Noyau de type Pénicilline	Pénams : Penicilline G Amino-pénicillines (ampicilline)= pénicilline A Carboxy-pénicillines (Carbénicilline...) Uréido-pénicillines (Azlocilline, Pipéracilline...) Isoxazolypénicillines (Oxacilline...) = Pénicilline M Carbaphénèmes (Imipénème) Oxapénams ou clavams (Acide clavulanique)
	Noyau de type Céphalosporine : Céphèmes et Oxacéphèmes	Céphalosporines de 1ère génération (Céfalotine) Céphalosporines de 2ème génération (Céfuroxime, Céfamandole) Céphalosporines de 3ème génération (Céfotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime...) y compris Céphamycines (Céfoxitine...) Céphalosporines de 3ème génération orales (Cefixime...) Céphalosporines anti Pseudomonas (Cefsulodine)
	Noyau bétalactame seul: Monobactams	ztréonam
Polypeptides	Bacitracine, Colistine, Polymyxine	
Glycopéptides	Vancomycine	
Quinolones	1ère génération (Acide nalidixique) 2ème génération ou Fluoroquinolones (Norfloxacin)	
Sulfamides et diamino-2-4-pyrimidines (sulfones)		
Tétracyclines (ou cyclines)	Tétracycline, Minocycline	

d- Mode d'action des antibiotiques

On considère les antibiotiques comme le groupe le plus important de médicaments pour la médecine (**Emmanuel, 2003**). Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre.

- **Action sur la paroi bactérienne**

Bacitracine, Pénicilline, Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, se qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) (**Zeba, 2005**) (**Gerard et al., 2003**).

- **Action sur la structure de la membrane**

En désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur (**Flandrois et al., 1997**).

- **Action sur la synthèse protéique**

Sur les ribosomes, ce qui entraine l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormale. Les aminoglycosides ou aminosides (Streptomycine, gentamycine, amykacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes (**Hermann, 2005**). Les phénicol (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaine peptidique en se fixant sur la petite sous-unité (**Flandrois et al., 1997**) les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaine peptidique , La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaine peptidique (**Nilius et Ma, 2002**).

- **Action sur la synthèse de l'ADN**

Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques (**Flandrois et al., 1997**), les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase (**Chopra, 1998**).

e- Résistance aux antibiotiques

De nombreuses molécules des antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique, ont été découvertes de la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970. Le succès fulgurant des premiers

Synthèse bibliographique

traitements anti-infectieux a fait considérer un peu hâtivement le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances des bactéries aux antibiotiques. Les bactéries ont su s'adapter et résister plus ou moins vite à chaque nouvel antibiotique introduit en thérapeutique (**Ploy *et al.*, 2005**).

- **Origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique**

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de la résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique). Soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, élément transposables ou intégrons (résistance extra-chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (**Mandell *et al.*, 2009**).

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches alors que la résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Inversement, la résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques (**Fauchère et Avril, 2002**), (**Ros, 1999**; **Meyer *et al.*, 2004**).

- **Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques**

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique (**Lavigne, 2007**). Alors ces micro-organismes ont développé trois types de mécanismes de résistance (**tableau 5**)

- Le premier est la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques
- Le deuxième est la modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ces derniers, comme par exemple la résistance aux fluoroquinolones par modification des topoisomérases de classe II.
- Le troisième mécanisme est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique. Ce phénomène peut être dû à un transport actif vers l'extérieur de la cellule via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux et/ou à une imperméabilité (Figure 07) (**Cattoir, 2004**) Une même bactérie peut présenter plusieurs de ces mécanismes de résistance (**Bevilacqua, 2011**).

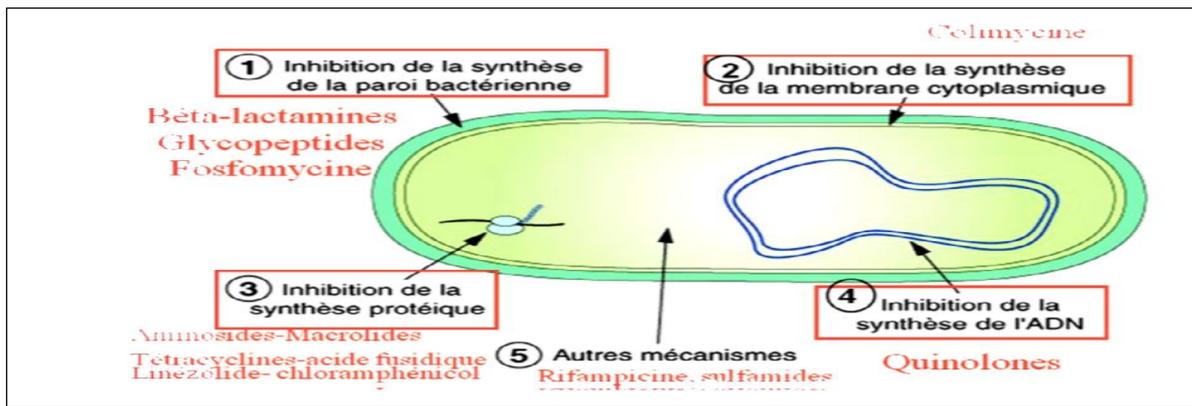


Figure 07 : différents mécanismes de résistance des bactéries (Bevilacqua, 2011)

I.1.3. Champignons et Antifongiques

I.1.3.1. Généralité sur les champignons

Les champignons sont des organismes filamenteux (moisissures) ou constitués d'une seule cellule (levures), capables de se développer sur la plupart des milieux, en particulier sur les aliments. On les trouve dans le sol, l'air, sur les revêtements de l'homme, des animaux, des plantes...ect. Les champignons ont tendance à apparaître comme des intrus (contaminants) sur les boîtes de Petri dans les laboratoires de microbiologie, où ils sont immédiatement reconnaissables par leur aspect cotonneux. (Jean .F et al ; 2007).

a. Moisissures

Les moisissures se développent en quelques jours sur de nombreux aliments qui deviennent impropres à la consommation (exemples le pain et les fruits moisis). Par contre, leur développement sur ou dans les fromages est nécessaire pour l'affinage de nombre d'entre eux (camembert, roquefort et autres fromages à pâte persillée). Elles se reconnaissent facilement par leur végétation filamenteuse ou duveteuse appelée mycélium. Le mycélium est constitué par l'assemblage de très nombreux filaments : les hyphes. Ces filaments contiennent les éléments de structure déjà observés dans une cellule eucaryote : - des noyaux bien identifiés, entourés d'une membrane, une membrane plasmique, un cytoplasme avec des mitochondries, des ribosomes et des substances de réserve (en particulier du glycogène). Ils sont entourés d'une paroi constituée essentiellement de chitine (substance constituant la carapace de certains insectes). Les filaments sont cloisonnés (les cloisons sont alors percées de pores) ou non cloisonnés. (Jean .F et al ; 2007)

b. Levures

Elles se présentent sous la forme de petites cellules (environ 10 µm dans la plus grande dimension) de forme variable mais souvent ovoïde. L'organisation cellulaire est de type eucaryote

Synthèse bibliographique

avec une paroi semblable à celle des autres champignons. Elles se multiplient par bourgeonnement. Les levures sont responsables de la fermentation alcoolique et interviennent donc dans la fabrication du vin, de la bière, du cidre, mais aussi du pain. Elles jouent un rôle non négligeable dans l'affinage des fromages. Les levures du genre *Candida*, en particulier l'espèce *Candida albicans*, sont pathogènes pour l'homme et responsables de lésions de la peau et des muqueuses, mais aussi d'infections profondes. Le muguet est une mycose à *Candida*, fréquente chez l'enfant, il se caractérise par le développement de *Candida albicans* sur l'ensemble de la muqueuse buccale. (Jean .F *et al* ; 2007)

I.1.3.2. Classification des champignons

La classification simplifiée suivante permet de distinguer deux grandes divisions qui se séparent chacune en une série de sous-groupes (Tableau 01). La première regroupe les Chromista ou Pseudomycota, pour les Oomycètes et les Hyphochytridiomycètes, à côté de certaines algues. La seconde regroupe les Fungi ou Eumycota, appelés également champignons "vrais" (Kachour. 2005).

Tableau 03 : Classification simplifiée des champignons (Kachour. 2005).

Division	Classe	Sous-classe
Chromista ou Pseudomycota	Oomycetes	-
	Hyphochytridiomycetes	-
Fungi ou Eumycota	Chytridiomycetes	Hemiscomycetidea
	Zygomycètes	Euascomycetidea Loculoascomycetidea
	Aseomycètes	Hemiascomycetidea Euascomycetidea
	Basidiomycètes	Teliomycetidea Eubasidiomycetidea
Deutéromyc		Hyphomycetidea
		Coelomycecetidea
		Blastomycetidea

I.1.3.3. Antifongiques

a. Notion des Antifongiques

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en

clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines. (Bellakhdar, 1997)

b. Classe des antifongiques et leur mécanisme de résistance .

- **Fluoropyrimidines**

Dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FuC) et le 5-fluorouracile (5-FUc), sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la cytosine. Ce sont des inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques. La 5-FuC est utilisée avec succès chez l'homme pour traiter une candidose systémique et une méningite à cryptocoque avec un pouvoir fongistatique (Duchinsky *et al.*, 1957). (Tassel et Madoff, 1968).

La résistance au 5-FUC peuvent être regroupés en deux catégories. Par mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FUC . Tels que mutation sur le gène FUR1, codant l'UPRT (Polak, 1977; Fasoli et Kerridge, 1988). (Francis et Walsh, 1992). La résistance à la 5-FUC peut également résulter d'une induction du métabolisme des pyrimidines, qui entrent alors en compétition avec l'antifongique (Polak, 1977).

- **Echinocandines**

Les échinocandines (Caspofungine, Mycafari, anidulafungine) , représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives (Denning, 2002). Ce sont des dérivés synthétiques de lipopeptides. Ces lipopeptides sont sécrétés à l'état naturel par plusieurs espèces de champignons. (Denning, 2002). Ils exercent un effet fongicide chez *Candida* et seulement fongistatiques sur les *Aspergillus* (Espinel, 1998 ; Oakley *et al.*, 1998).

La résistance au Echinocandines provoqué par mutation ponctuelle sur les gènes FKS1 ou FKS2 (Park *et al.*, 2005; Balashof *et al.*, 2006). Autrement certaines espèces de levures et de champignons filamenteux sont capables de croître en présence de fortes concentrations en échinocandines, bien supérieures à la CMI (Stevens *et al.*, 2005 ; Perlin, 2007).

- **Polyene**

Plus de 200 molécules appartenant à la classe chimique des polyènes, pour la plupart isolées chez des bactéries du genre *Streptomyces*, ont une activité antifongique. Cependant, seules trois molécules ont une toxicité suffisamment limitée pour permettre leur utilisation en clinique : l'amphotéricine B (AmB), la nystatine et la natamycine. (Dutcher *et al.*, 1959) .Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons.

Synthèse bibliographique

Bien que de plus en plus fréquemment rapportée, la résistance aux polyènes reste un événement relativement rare chez les isolats cliniques de champignons pathogènes. Les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe. Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible, l'ergostérol (**Kanafani et Perfect, 2008**)

- **Azolés**

Les dérivés azolés sont de loin les antifongiques les plus utilisés en clinique avec un effet fongistatique. Sont divisées en deux groupes, les imidazolés, (**Maertens, 2004**). Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Ils inhibent spécifiquement la lanostérol 14 α déméthylase à cytochrome P450, codée par le gène ERG11. (**Carillo et al., 2006**)

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés peuvent être répartis en quatre catégories (**Sanglard, 2002**). Une diminution de l'affinité des azolés pour leur cible peut être à l'origine de la résistance. Ainsi, une mutation ponctuelle du gène ERG11, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 α déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme (**Vanden et al., 1990, Marichal et al., 1999**).

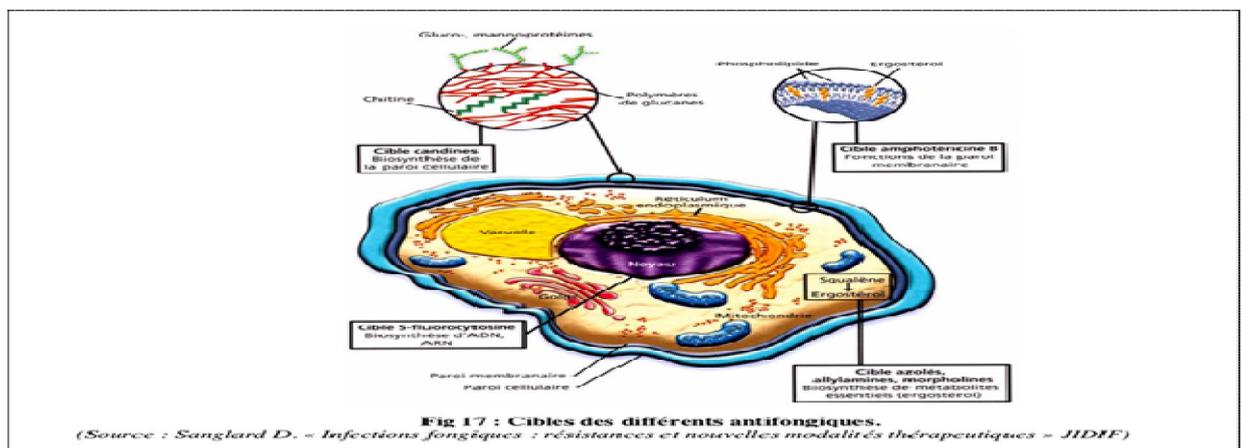


Figure 08 : Cibles des différents antifongiques. (Sanglad, 2014)

c. Mécanismes d'action antifongiques

- **Inhibition de la formation de paroi cellulaire**

La paroi cellulaire fongique est principalement constituée de β -glucanes. Si la synthèse de ces composés est inhibée, l'intégrité de la paroi cellulaire va se perturber (**Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009**).

- **Rupture de la membrane cellulaire**

Les ergostérols sont essentiels pour la membrane cellulaire. Si ces stérols sont liés par des médicaments antifongiques, ou si leur synthèse est inhibée par des inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol, l'intégrité de la membrane cellulaire va se rompre. La membrane devient alors étanche (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

- **Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique**

L'inhibition du transport d'électrons mitochondrial entraînera une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. L'inhibition peut se produire via l'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, entraînant une réduction de la production d'ATP et la mort cellulaire subséquente (Walker et White, 2011 ; Kim et al., 2013).

- **Inhibition de la division cellulaire**

L'inhibition de la division cellulaire peut se produire par l'inhibition de la polymérisation des microtubules, inhibant ainsi la formation du fuseau mitotique (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

- **Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique**

Si l'agent antifongique pénètre dans la cellule, par exemple via un transport actif sur des ATPases, et interfère avec l'ARN, il peut provoquer une synthèse d'ARN défectueuse et une inhibition de la transcription de l'ADN. L'inhibition de la synthèse des protéines est également une cible antifongique connue (Clanahan, 2009).

- **Inhibition des pompes d'efflux**

Les pompes à efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes et leur fonction est de transporter des substances toxiques hors de la cellule (Kang et al., 2010). Ce transport inclut souvent le transport du médicament accumulé hors de la cellule fongique. La surexpression des pompes d'efflux peut conduire à une pharmacorésistance. En inhibant les pompes d'efflux, on pense que la résistance aux médicaments peut être réduite (Kang et al., 2010).

I.1.3.4. Rôle des plantes médicinales dans la lutte contre les champignons

L'augmentation de la résistance fongique aux médicaments classiques et le fait que la plupart des médicaments antifongiques n'ont qu'une activité fongistatique, justifient la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les infections fongiques.

plante de
Retama
sphaerocarpa
(L.) Boiss

I.2. Généralité sur la plante de *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss

I.2.1. Généralité sur les plantes médicinales

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Farnsworth et al., 1985 ; Fabricant et al., 2001 ; Anne et al., 2008**).

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Malgré cette biodiversité immense contient l'Algérie, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Retama Sphaerocarpa*, des labiées très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen (**Espigares et al., 2004**).

I.2.2. Famille des Fabacées

La famille des Fabacée ou légumineuses est une grande famille des plantes Magnoliophytiques regroupant 12000 espèces réparties en plus de 650 genres Ce sont des plantes herbacées, des arbustes, des arbres ou des lianes. La famille est cosmopolite des zones froides à tropicales. La fonction chlorophyllienne est parfois transférée aux tiges. De feuilles normalement composées pennées rarement bipennées, alternes, stipulées, parfois transformées en vrilles simples, folioles toujours à bord entier, parfois avec points translucides de forme très variables mais presque asymétriques. Les racines présentent des nodosités où vivent des bactéries symbiotiques du genre rhizobium. L'inflorescence est en racèmes ou en panicules rarement de Californie. De fleurs hermaphrodites zygomorphes. Les fruits sont des gousses ou appelés aussi des légumes, sont coriaces ou ligneuses, déhiscentes ou indéhiscentes à maturité s'ouvrant en deux valves, chacune porte une rangée de graines ex albuminées, parfois samaroides (**Damination, 2005**).

En Algérie, les fabacées ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification. Le genre *retama* occupe une place considérable dans les régions arides et semi-arides (**Porter, 2001**). En Algérie, trois espèces rattachées à ce genre sont signalées : *Retama monosperma* Boiss. *R. raetam* Webb. Et *R. sphaerocarpa* L. (**Quézel et Santa, 1962 ; Boulila et al., 2009**).

I.2.3. Présentation des espèces

I.2.3.1. Morphologie générale

Les rétames sont des plantes pérennes, ce sont des arbustes monoïques, pouvant atteindre jusqu'à 3 mètres de long, caractérisées par un tronc trapu et court, portant de nombreux rameaux dense, arqués, flexibles et retombants, fortement sillonnés et peu feuillés dans le but de s'adapter au milieu désertique où l'eau est rare (Shalaby *et al.*, 1972), les jeunes arbustes sont soyeux d'un vert argenté à gris argenté (Beniston, 1985 ; Ozenda, 1958).

Les feuilles sont très caduques, les inférieures sont trifoliolés les supérieures sont simples et unifoliées (Quezel et Santa, 1962), Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (Shalaby *et al.*, 1972). Elles sont de deux couleurs selon l'espèce : (Figure 09)



Figure 09 : a. *Retama raetam* (Forssk.), b. *Retama monosperma* (L.) Boiss , c. *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. (Webb et Berth) .

a. *Retama monosperma* (L.) Boiss

Arbuste de 2 à 4 m des dunes littorales, Fleurs blanches de 14-15 mm étendards plus court que la carène, légèrement veiné de pourpre corole blanche, gousse à suture ventrale dilatée, ovoïde, portant une seule graine de couleur vert olive (Figure 10) (Quezel et Santa, 1962)



Figure. 10 : L'espèce *Retama monosperma* (fleur, arbre) (djelloul, 2004)

b. *Retama raetam* (Forssk) Webb

Retama raetam, Arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à rameaux veloutés, les fleurs blanches, grandes (8 -10 mm), en grappes pauciflores de 5 à 10 fleurs ; gosses ovoïdes, aiguës, terminées en bec. Les rameaux fortement sillonnés en long. Elle se trouve dans les dunes et lits des

Synthèse bibliographique

oueds, les feuilles sont très caduques, les inférieurs sont trifoliolés, les supérieurs simples et unifoliées. La floraison de la plante de l'Avril au Mai. Le fruit est une étroite gousse indéhissante de moins de 2 cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines (Figure 11) (Quezel et Santa, 1962)



Figure 11 : L'espèce *Retama Raetam* (web)

c. *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss

Retama sphaerocarpa (L.) Boiss est une légumineuse arbustive vivace, de 1 à 2 m de haut, à rameaux pubescents plus au moins dressés. Elle porte un grand nombre de branches vertes de différentes longueurs donnant à l'espèce une structure ouverte, et représentant la majorité de sa biomasse aérienne. Les feuilles caduques sont très petites et les fleurs sont jaunes et très petites aussi (5-6 mm), en grappes latérales de 8 à 15 flores disposées sur les rameaux âgés. Les fruits sont couverts par une couche dure et germe en hiver (Janvier– Février) (Figure 12). Elle est parmi les trois espèces appartenant au genre *Retama* trouvés en Algérie. Aujourd'hui, *Retama Sphaerocarpa* (L.) Boiss se répand en raison de sa forte capacité à coloniser les champs agricoles abandonnés (Espigares *et al.*, 2004)

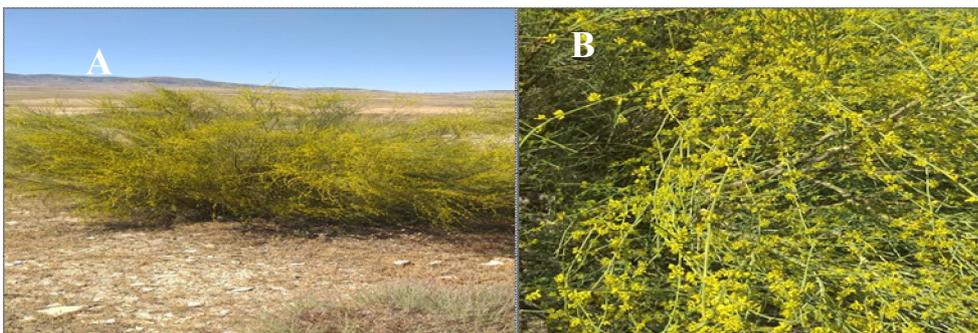


Figure 12 : Plante de *Retama sphaerocarpa* (photos personnelles)

I.2.4. Nom Vernaculaire de L'espèce *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.

- Nom scientifique : *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.
- Noms locaux :

Arabe : Rtem. (Quezel et Santa, 1963)

Berbère : Tillugwât, îllugwât, allugû, talggût. (Bellakhdar, 1997) ;

Français : Rétam. (Quezel et Santa, 1963).

I.2.5. Systématique

La classification botanique de cette plante est résumée sous forme d'arbre phylogénique donnée en figure 13

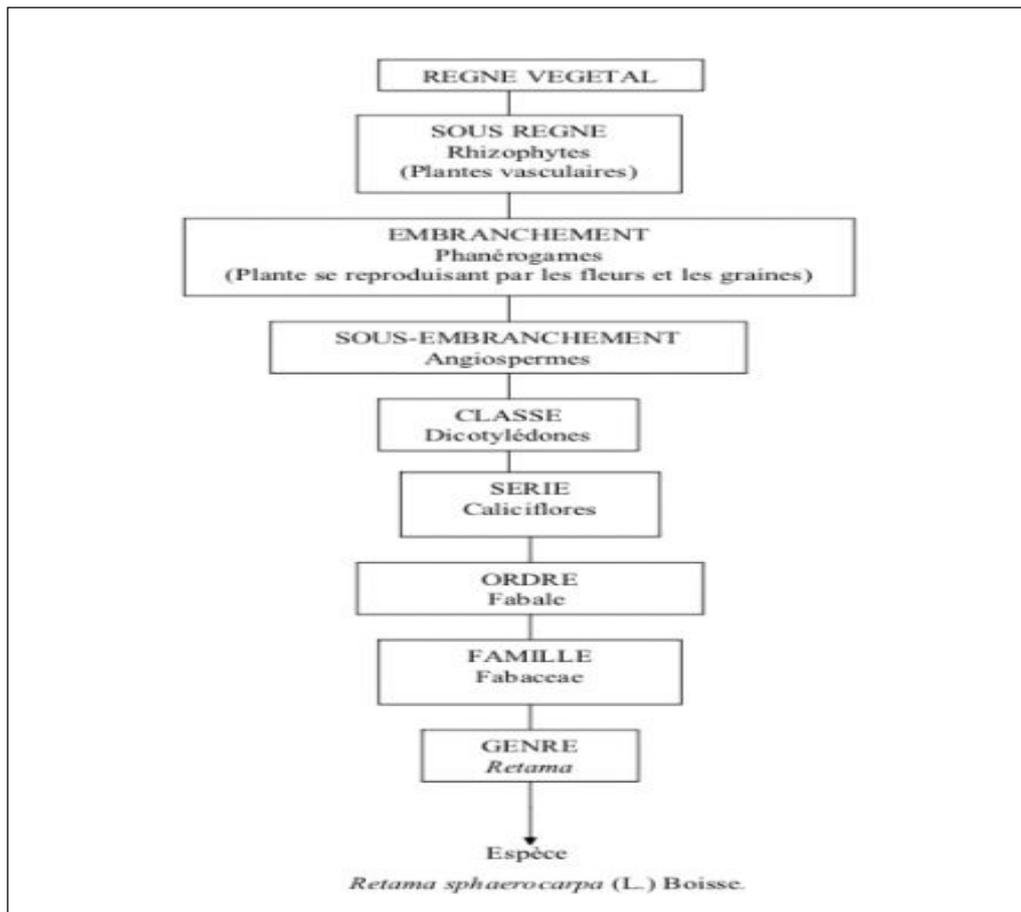


Figure 13 : Arbre phylogénique de *Retama sphaerocarpa* (L.) Boisse (Quezel et Santa, 1963).

I.2.6. Distribution géographique du genre Rétama, en Algérie et dans le monde

Les rétamas sont caractérisées par une large distribution géographique, originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries (Zohary, 1959). En Algérie les rétamas occupent une surface considérable du nord vers le sud (Thomas, 1968 et Stocker, 1974). (tableau 04)

Synthèse bibliographique

Tableau 04 : Récapitulatif de la répartition géographique du genre *Retama* dans le monde selon ILIDIS¹

	<i>R. monosperma</i> . Boiss	<i>R. raetam</i> (Forsskal) Webb	<i>R. sphaerocarpa</i> . Boiss
Afrique	Algérie (N) Maroc (N) Egypte (N)	Algérie (N) Maroc (N) Tunisie (N) Libye (N) Egypte (N) Saharaoccidentale (N)	Algérie (N) Maroc (N) Tunisie (N)
Europe	Italie (I) Portugal (N) Espagne (N)	Grande Bretagne (I) Sicile (N)	Bulgarie (I) Portugal (N) Espagne (N)
Australie	Australie (I) Tasmanie (I)		
Moyen orient		Les frontières Israélo-jordanienne (N) Les frontières Libano Syrienne (N) Arabie Saoudite (N) La péninsule du Sinaï (N)	Argentine (I)
Amérique du sud	Argentine (I)		

(N) : native. (I) : introduite

Retama sphaerocarpa est une plante qui croît dans les pâturages rocailleux et argileux des montagnes, forêts claires, bords des torrents dans les steppes (Maire, 1952). Cette espèce est répandue en Espagne, au Portugal et en Afrique du nord et très rare au Sahara.

En Algérie, *R. sphaerocarpa* est signalée à Ain Sefra, Oued M'zab, Constantine, Maillot, Bouira (Quezel et Santa, 1962). En petite Kabylie, Ghardaïa, Djebel Amour, les plaines de Batna et Maadid de M'sila. (Zohary, 1962) (Mittler et al, 2002), elle est signalée aussi à Ain Sefra, Oued M'zab, Constantine, Maillot, Bouira (Quezel et Santa, 1962).et également Tébessa, Située au nord de Djbel doukana à 4 km de la frontière Algéro-tunisienne selon (Benmiloud et al., 2011) (figure 14).



Figure 14 : Distribution géographique de trois espèces de *Retama* en Algérie (Benmiloud et al., 2011)

I.2.7. Importance du genre *Rétama*

I.2.7.1. Importances en médecine traditionnelle

Selon **Bellakhdar, (1997)** l'espèce est utilisée traditionnellement sous des formes différentes

- Les tiges et les feuilles, pillées avec du miel, absorbées par voie orale, sont utilisées comme vomitif. En lavements rectaux, la décoction des feuilles est administrée comme purgatif et vermifuge ;
- La poudre des feuilles et des fleurs séchées de l'espèce est utilisée comme cicatrisant dans les circoncisions, comme vulnéraire, antiseptique et sédatif dans les soins locaux des plaies, blessures, ulcérations de la peau et boutons purulents ;
- La plante, broyée dans du lait ou du beurre, est utilisée pour les mêmes indications et la décoction s'emploie, en frictions, contre le prurit et la gale humaine et animale ;
- Les racines de cette espèce sont très utilisées, comme abortif, en fumigations ou en lavements vaginaux ;
- L'infusé des feuilles et des fleurs peut être bu mais en raison des risques d'intoxication, qui sont connues de tous, cette forme d'utilisation est plutôt rare ;
- La plante a été utilisée pour empoisonner les puits, pendant la guerre des tribus au Maroc
- Au Sahara, les tiges de *Rétama* sont employées pour faire des pointes de feu contre diverses algues dans la sciatique ;
- La flagellation à l'aide des tiges de *Rétama* intervient dans le traitement des enflures et de la folie pour chasser les mauvais esprits, responsables, d'après les croyances traditionnelles de la perte de raison.

I.2.7.2. Importances écologiques

En Algérie, les *Rétamas* occupent une place considérable dans la flore ligneuse des dunes côtières et dunes sablonneuses du désert. Grâce à son potentiel fixateur d'azote, cette légumineuse arborescente joue un rôle écologique important dans la formation des îles de fertilité "Island of fertility" où peuvent se développer plusieurs espèces annuelles et d'autres espèces ligneuses (**Pugnaire et al., 1996**).

Son expansion dans les zones arides et semi-arides Algériennes, est due à son adaptation aux conditions environnementales difficiles qui caractérisent l'habitat de dune, comme la rareté de l'eau et les nutriments, la mobilité du substrat et les embruns salins. En effet une étude récente a confirmé que *Monosperma* peut tolérer une salinité relativement élevée (**Gallego et al., 2010**). Par ailleurs,

grâce à son système racinaire important, pouvant atteindre une vingtaine de mètres (**Haase et al., 1996**). Cette espèce joue un rôle considérable dans la stabilisation des sables dunaires mobiles.

1.2.7.3. Importance médicinale et pharmaceutique du genre *Rétama*

Les espèces du genre *Rétama* présentent de nombreuses vertus thérapeutiques, grâce aux alcaloïdes et aux flavonoïdes qu'elles renferment dans ces organes. Des extraits phénoliques, isolés à partir des plants en fleurs de *R. monosperma* ont induit une activité inhibitrice de cellules tumorales de certains cancers cérébraux humains et peuvent être donc utilisés dans la préparation des médicaments destinés à combattre le cancer (**Merghoub et al., 2009 ; Belayachi et al., 2014**).

Selon (**Unesco, 1995**) *Rétama* a été répertorié comme étant plante médicinale des régions arides. En outre, **Maghrani et al. (2003)**, a démontré que des extraits de *R. raetam* ont une activité hypoglycémique chez des rats diabétiques. De plus un effet antioxydant significatif a été évalué chez *R. raetam* (**Conforti et al., 2004**) et récemment chez *R. monosperma* par **Belmokhtar et al. (2014)**. Aussi, **González-Mauraza et al. (2013)**, a démontré qu'un extrait aqueux isolé à partir de *R. monosperma* avait une activité anti-inflammatoire chez le rat (comme modèle de la maladie de Crohn)

Ces plantes renferment également des sous-produits pouvant être exploités en médecine tels que les alcaloïdes (**El-Shazly et al., 1996**) et les flavonoïdes (**Martin-Cordero et al., 1999 ; Akkal et al., 2010**). L'un des intérêts médicaux de ces plantes réside également dans le traitement du diabète. En effet, leur effet hypoglycémiant a été vérifié dans les travaux d'**Algandaby et al. (2010)**. Selon (**MAGHRANI, 2004**), l'administration d'extraits aqueux de *Rétama raetam* induit une baisse de la concentration des triglycérides dans le plasma des rats normaux et diabétiques et conduirait à une baisse significative du poids.

D'autre part, Des extraits phénoliques, isolés à partir des fleurs de *R. monosperma* ont induit une activité inhibitrice de cellules tumorales de certains cancers cérébraux humains et peuvent être donc utilisés dans la préparation des médicaments destinés à combattre le cancer (**Merghoub et al., 2009 ; Belayachi et al., 2014**).

Retama monosperma renferme dans ces organes des alcaloïdes et des flavonoïdes qui sont vraisemblablement produits au cours des réactions de défense en réponse à une agression par les agents pathogènes. En effet des études biochimiques ont mis en évidence le rôle des quinolizidines (alcaloïdes) contre les prédateurs (herbivores) et à degré moindre contre les microorganismes et les plantes compétitives (**Wink, 1985 ; Wink, 1987**).

De ce fait, nous constatons la large capacité pharmacologique des rétames et leur éventuelle utilisation en phytothérapie et donc la nécessité d'approfondir les connaissances sur ces espèces, au niveau moléculaire et génétique

I.2.7.4. Importance industrielle et économique

Les rétames sont considérés comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage. Ils sont riches en fibres, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm (**Bahi, 1991**). Ces plantes pourraient donc être valorisées dans l'industrie papetière comme l'alfa.

Les rétames sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes. Les graines des rétames contiennent des lectines, protéines allergènes, utilisées par la plante dans les mécanismes de défense contre les insectes, ce qui pourrait donc être valorisé dans l'industrie des bio insecticides.

Différentes études (microbiologique, botanique...) ont été effectuées sur *Rétama raetam* telles celles portant essentiellement sur l'activité des métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Rétama raetam* (**Zerroug, 2011**) d'une part D'autre part, une étude floristique des formations sahariennes et de la germination des graines de *R. raetam* de la région de Taleb El Arbi (W. El Oued) ont été réalisées par (**Chalabi, 2008**).

Extraits de Rétama

I.3. Extraits de Rétama et leurs utilisations

I.3.1. Généralité sur les extraits des plantes

I.3.1.1. Phytochimie

C'est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction, ainsi que les méthodes d'analyses, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Elle est indissociable avec les autres disciplines telles que la Pharmacognosie (**Pietro, 2004**).

I.3.1.2. Définition des Principes actifs

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments. Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (**DI-PIETRO. M.,2004**).

Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...) . Ces composés sont des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes. (**Stalikat, 2007**)

I.3.1.3. Différents groupes des Principes actifs

Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont trois grands groupes chez les plantes :

- Composés Phénoliques : tanins, lignine, flavonoïdes
- Composés Azotés: alcaloïdes, bétalaïne, hétérosides cyanogènes et glucosinolates
- Terpènes: hémiterpènes(C5), monoterpènes (C10), sésquiterpènes (C15), Diterpènes (C20), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (+ que C40). (**Macheix,2005**)

I.3.2. Copositions des extraits des plantes

Plusieurs compositions peuvent être trouver dans les plantes

I.3.2.1. Polyphénols

Les polyphénols communément dénommés composés phénoliques sont présents de façon ubiquitaire dans le règne végétal (**Scalbert et Williamson, 2000**) depuis les racines jusqu'aux fruits.

Ils possèdent plusieurs structures chimiques variées (Mompon *et al.*, 1998).

- **Classification et structure des polyphénols**

Plusieurs classifications des polyphénols ont été classé selon la nature de leur squelette carboné, (Ribereau, 1968) les a classé comme suit qui est :

- Acides benzoïques, acides cinnamiques et coumarines
- Flavones, flavanols et dérivés
- Chalcones, déhydrochalcones et aurones
- Anthocyanes

Rodriguez Vaquero *et al.* (2007) les ont subdivisés en flavonoïdes et en non Flavonoïdes (figure 15)

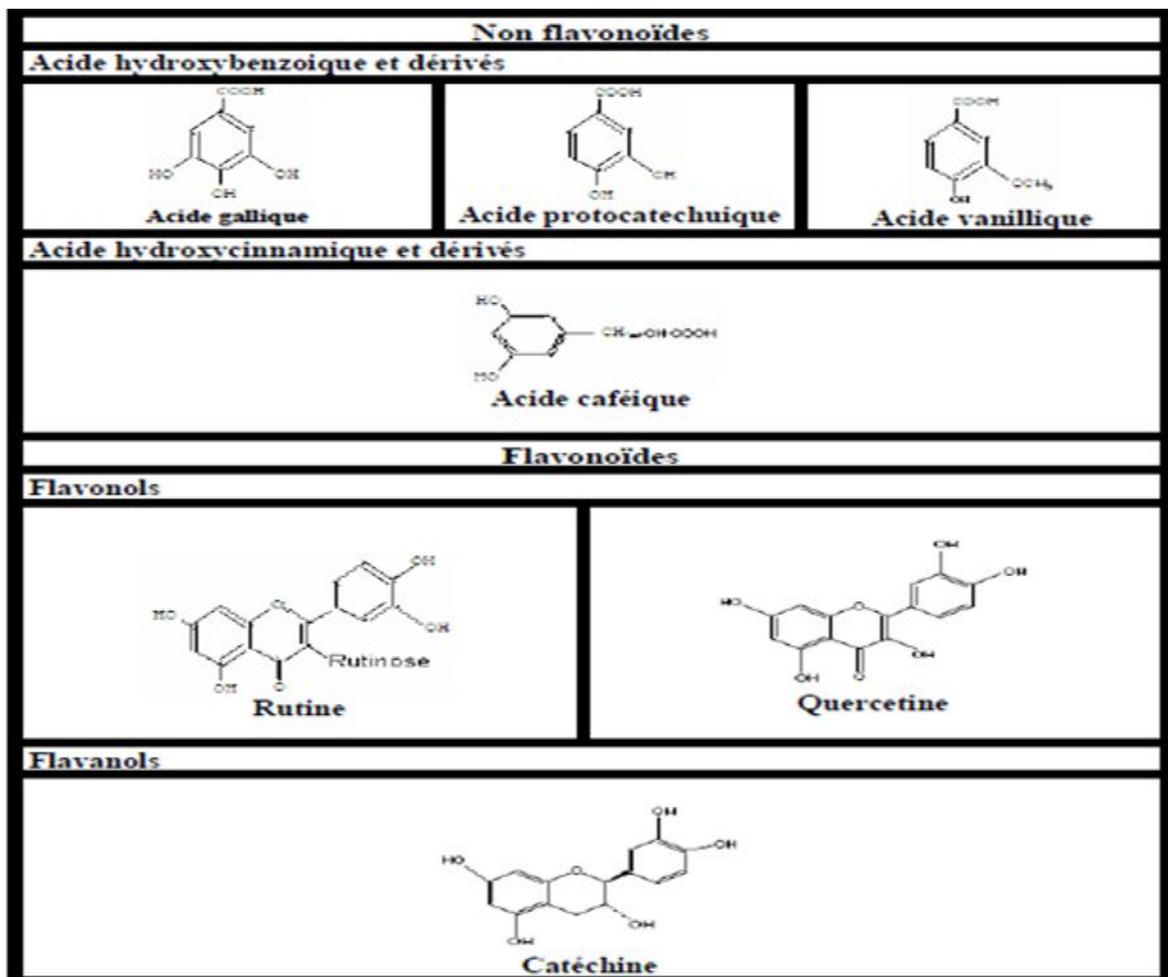


Figure 15 :Classification des polyphénols selon Rodriguez *et al.* (2007)

a. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques trouvé chez les plantes vasculaires (Harborne et Sherratt, 1961 ; Hasten, 1983) Ils forment des pigments

Synthèse bibliographique

responsables de colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Harborne et Sherratt, 1961 ; Middleton *et al.*, 2000**). On les rencontre assez souvent dans les fruits, les légumes mais également dans plusieurs plantes médicinales (**Cooray *et al.*, 2004**). Les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes selon leur degré d'hydroxylation, méthylation et glycosylation (**Harborne et Sherratt, 1961**). Plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central : flavonols, flavanols (**Stöckigt *et al.*, 2002**)

b. non flavonoïdes

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les murs. Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café (**Bruneton,1993; Velazquez *et al.*, 2003**).

I.3.2.2. Terpènes

Les terpènes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques, et des activités biologiques très diverses. (**Minkue ,2000**). Ce sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles (**Lamarti *et al* ; 1994**).

I.3.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, d'origine naturelle à structures complexes. Certains alcaloïdes dérivent soit des acides aminés (alcaloïdes vrais), soit des terpènes (alcaloïdes terpéniques ou proto-alcaloïdes).D'autres sont des amines simples où l'atome d'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique (cas des pseudo-alcaloïdes) (**Bruneton, 1993**).

I.3.3. Utilisations des extraits des plantes

- **Une pratique de prophylaxie**

Déjà utilisée dans l'antiquité. C'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym, du gingembre ou simplement du thé vert. Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique (**Sabai et Boudali, 2012**).

- **Une pratique traditionnelle**

Parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

- **Une pratique basée sur les avancées scientifiques**

Qui recherche des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation des phytomédicaments est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP) pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine (**Gabbiche, 2009**) On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

I.3.4. Extraits des *Retama* et Substances Naturelles

I.3.4.1. Technique d'analyses des extraits de l'espèce *Retama sphaerocarpa*

La chromatographie liquide haute performance couplée à la masse et à l'ultraviolet visible HPLC/IV-vis-DAD/ ESI-MS

- Chromatographie gazeuse couplée à la masse GC/MS. (**Romani et al, 2003 et Wu et al, 2004**).

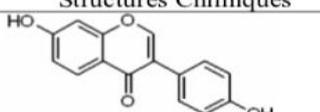
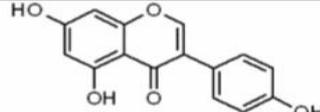
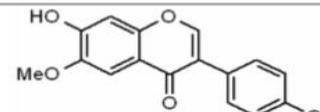
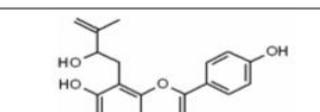
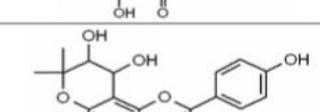
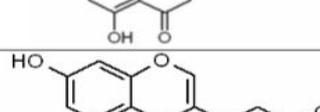
I.3.4.2. Extraits des *Retama*

En général les *Retamas* ont fait l'objet de nombreuses études pour leur toxicité quant aux métabolites secondaires qu'elles produisent, ce sont des plantes productrices de substances naturelles biologiquement actives. **Boussahel, (2010)** décrit en détail les composés contenus dans l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa*. D'après les valeurs indiquées dans le tableau (05). Il y a une prédominance de la présence de plusieurs isoflavones (daïdzéine, génistéine glycitéine) et de leurs dérivés. Le composé qui présente le pourcentage le plus élevé est les dérivés de daïdzéine avec un pourcentage égale à 32%, suivie de génistéine glucoside étant de 12.7%. L'analyse a détecté la présence du méthyle carnosate avec un pourcentage de 1.6%.

Synthèse bibliographique

Tableau 05: Composés contenus dans l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa*. (A) pourcentages des composés, Structures chimiques de quelques composés. (Boussahel,2010)

Composés	(%)
Dérivé de daidzéine	32
Dérivé de génistéine (2)	3.7
Glycitéine-glucoside	2.5
Daidzéine-glucoside	4.4
Génistéine 8-C-glucoside	10.3
Génistéine-glucoside	12.7
Daidzéine-glucosyl- malonate	2.6
7 hydroxy- 6'méthoxy- 3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside	11.8
Génistéine glucosyl- malonate	7
Dérivé de génistéine acétyle	4.5
Génistéine	1.35
Composé 8 acétate	1.4
Méthyle carnosate	1.6
Dérivé de génistéine (16)	4.2

Composés/Mw	Structures Chimiques
Daidzéine Mw = 254.25.	
Génistéine Mw = 270.24.	
Glycitéine Mw = 284.26.	
Ephedroidine Mw = 354.	
5,4'-dihydroxy-(3,4dihydro-3,4dihydroxy)-2,2 diméthylpyrano-(5,6:7,8)-flavone; Mw = 370.	
7 hydroxy-6'méthoxy-3',4' méthylénedioxy isoflavone-glucoside	

MW=poids moléculaires

Vingt-huit alcaloïdes ont été isolés à partir des trois espèces du genre *Retama* d'après **El-Shazley et al. (1996)** (Tableau 05). Spécifiquement et à partir du *Retama sphaerocarpa*, plusieurs alcaloïdes ont été isolés, entre autres la cytosine, la sphaerocarpine, l'anagryne, la lupamine et la rétamine.

El-Shazly et al., (1996) ont pu isoler des alcaloïdes quinolizidiniques, des fleurs et des tiges de cette plante. La spartéine a été l'alcaloïde le plus abondant dans les tiges et l'anagryne dans les fleurs. Plusieurs travaux ont révélé aussi la présence, dans la partie aérienne de *Retama sphaerocarpa*, des flavonoïdes tel que le rhamnasine (**Louaer et al., 2007**) (Tableau 06).

Tableau 06: noms chimiques de quelques alcaloïdes isolés de *R.monosperma*, *R. raetam*, *R. sphaerocarpa* (El-Shazly *et al.*, 1996).

	retamine	
	anagyriine	
<i>R. monosperma</i>	cytisine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996
	lupanine	
	sphaerocarpine	
	Methylcytisine	
<i>R. raetam</i>	sparteine N-cytisine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996
	retamine	
	anagyriine	
	lupanine	
<i>R. sphaerocarpa</i>	retamine	El-Shazley <i>et al.</i> , 1996
	alpha-sparteine	
	cytisine	
	sphaerocarpine	

L'analyse quantitative fait par (hammouche *et al.*, 2006) concernant les extraits des *Retama raetam* et *R. sphaerocarpa* en Algérie, ont montré que le flavonoïde le plus abondant de l'extrait aqueux était la génistéine isoflavone ($610,0 \pm 2,8$ et $408,0 \pm 14,1$ mg / 100 g respectivement). Tandis que la spartéine était l'alcaloïde prédominant dans Rr et la rétamine dans Rs. Plusieurs autres travaux ont révélé aussi la présence, dans la partie aérienne de *Retama sphaerocarpa*, des flavonoïdes tel que le rhamnasine (Louaar *et al.*, 2007)

Quant aux flavonoïdes et iso-flavonoïdes, plusieurs études montrent que la partie aérienne des différentes espèces du genre *Retama* sont très riches de ces molécules citons les exemples de: 7-hydroxy-6'-methoxy-3'.4'methylenedioxyisoflavone 7-o- α -glucoside (6'methoxypseudobaptigenin 7-o- α -glucoside), un isoflavone de type genistein 7-o- α -glucoside (genistin), le daizein 7-o- α -glucoside (daizein) (López *et al.*, 1998).

Il est intéressant de noter aussi que *R. raetam* et *R. sphaerocarpa* contiennent de rares flavones, des retamatrioside (Louaar *et al.*, 2005) et qu'un nouveau iso-flavonoïde a été identifié chez *R. retam*, genistein 7-O-xylosyl 8-C-glucoside (Akkal *et al.*, 2010).

I.3.5. Activités biologiques des extraits des retamas

Les polyphénols sont connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain. Ainsi, (Quideau *et al.*, 2011). Confirme que les polyphénols sont connus par leurs activités anti-oxydantes. En effet, en conditions physiologiques, le dioxygène produit au niveau des mitochondries des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est toxique pour l'intégralité de la cellule. Dans ce cas l'activité anti-oxydante des polyphénols peut se faire par piégeage direct des ERO aussi bien en phase aqueuse qu'en phase organique. Ces polyphénols

Synthèse bibliographique

peuvent agir aussi par deux autres mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition des enzymes pro-oxydantes et la chélation des ions métalliques et un deuxième consiste à la protection des systèmes biologiques de défenses anti-oxydantes.

Les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des : L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS et la protection des systèmes de défense antioxydants. De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités : anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses, anti-ulcèreux, anti-carcinogènes, anti-bactériennes et anti-microbiennes (**Abelghafour, 2003**)

Les acides phénols sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires (cas des arbutosides). Les propriétés anti-inflammatoires sont surtout attribuées aux dérivés salicyliques (**Vélasquez *et al.*, 2003**), anti-tumorale, antifongique et antibactérienne. Certains esters hétérosidiques phénylpropanoïques peuvent inhiber les enzymes de la phosphodiesterase de l'AMPc (**Bruneton, 1993**). Leurs propriétés anti-microbienne et anticancéreuse ont aussi été montrées (**Raj Narayana *et al.*, 2001** et **Yenjai *et al.*, 2004**). Une activité anti-HIV leur a également été attribuée grâce à leur potentiel inhibiteur anti-VIH (vis-à-vis de la transcriptase inverse et l'ADN-polymérase de ce virus). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus comme le virus respiratoire syncytial, l'herpès simplex virus et les adénovirus (**Nijveldt *et al.*, 2000**).

Les coumarines possèdent une grande activité pharmacologique. Elles manifestent diverses activités: anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (**Hoult et Payd, 1996**). Concernant l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (**Cottiglia *et al.*, 2001**).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

Les différentes recherches effectuées dans cette étude ont été réalisées au niveau du :

- Laboratoire pédagogique du département biologie appliquée.
- Laboratoire pédagogique de département des sciences de la terre et de l'univers.

II.1. Obtention de l'extrait méthanolique

II.1.1. Matériel végétal

Les feuilles du *Raetama sphaerocarpa* ont été récoltées le mois mars 2019 dans la région de SERDIES (sud-ouest de wilaya de Tébessa).



Figure 16 : Région de récolte de la plante (SERDIES, Tébessa) / Google Earth

(<https://earth.google.com/web/@11.21507058,-69.73979757,1554.42740952a,196297.53717145d,35y,0h,0t,0r>)

L'identification du genre et de l'espèce a été faite par Mme Hioun (Enseignante de Botanique au département de Biologie des êtres vivants) sur la base de la Clé de Quezel et Santa (1963). Les feuilles ont été séparées manuellement, séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyées à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine nécessaire à la préparation de l'extrait.



Figure 17: Plante étudiée : *Retama sphaerocarpa* (photo personnelle)

II.1.2. Matériel d'extraction

Le Tableau ci-dessous représente les différents matériels et les instruments utilisés pour la procédure d'extraction.

Tableau 07 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

Appareil	Verreries et Autres	Solvant et Soluté
Balance (Scout Pro)	Eprouvette de 500 ml	Eau distillé
Hydro-distillateur de type Clevenger : • Chauffe-ballon • Ballon en verre pyrex 2000 ml • Une colonne • Un réfrigérant • Un collecteur	Flacon en verre du 5 ml	Methanol
	Pissette	
	Entonnoir	
	Bécher de 50 ml	
	Papier aluminium	

II.1.3. Procédé d'extraction

Une quantité de 100 g de poudre de la plante a été macérée dans 1000 ml du méthanol pendant 72h à température ambiante. La macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. L'extrait a été récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. Le méthanol est éliminé du filtre par évaporation rotative dans un rotavapor (BÜCHI). L'extrait a été conservé pour l'utilisation ultérieure.

II.1.4. Calcule du rendement d'extrait

Le rendement en extrait méthanolique a été déterminé par le rapport entre la masse d'extrait obtenu et celle de la matière sèche utilisée selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait (g)}}{\text{Masse de la matière végétale utilisée (g)}} \times 100$$

R : Rendement de l'extrait

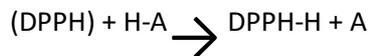
II.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité anti-radicalaire d'EM-Rs a été évaluée dans ce travail en adoptant deux types de tests *in-vitro*. Il s'agit de la méthode de piégeage du radical DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle) et le test de réduction du fer (FRAP : ferric reducing antioxidant power).

II.2.1. Test d'activité DPPH

- Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al. 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. L'efficacité d'un antioxydant est proportionnelle à la réduction de la coloration bleue, (Figure : 18) due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotometrie à 517 nm.



DPPH : 2.2 diphényle- 1- picryl-hydrazyl

AH : un composé capable de céder un H au radical DPPH

A : le composé oxydé après la réduction de DPPH

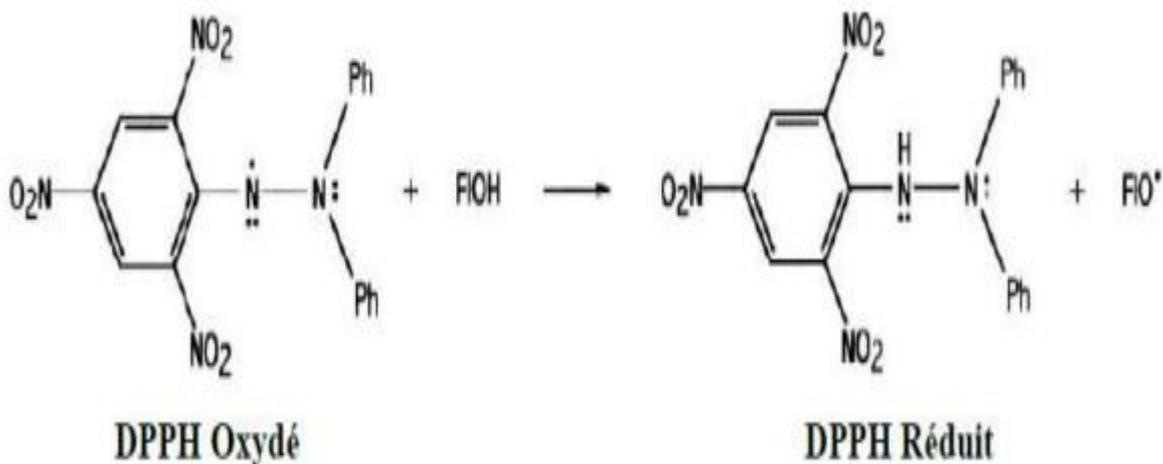


Figure 18 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Amié, 2003)

II.2.1.1. Matériel et réactifs

Les différents matériels et les réactifs utilisés sont résumés dans le Tableau 08.

Tableau 08 : Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH.

Appareil	Verrerie et Autres	Réactifs	Solvant et Solutés
Spectrophotométrie UV-VISIBLE 1700 (Pharma Spec SHIMADZU)	Eprouvettes graduées de 25 ml	Acide ascorbique	Méthanol
	Spatule		Eau distillé
	Fiole jaugée 50ml et 100ml		
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Bécher de 50 ml	le DPPH (2,2 diphényle-1-picryl hydrazyl)	
	Verre de montre		
Balance de précision (ALS286 4N)	Tube à hémolyse de 05 ml avec un portoir	Extrait de retama	
	Les embouts jaunes et bleus		
	Entonnoir		
	Papier aluminium		

II.2.1.2. Mode opératoire

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au DPPH. 25µl de chaque solution méthanolique de l'extrait à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 600, µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) sont ajoutés à 2.5 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,004%) qui est préparée par la solubilisation de 0,004g de DPPH poudre dans 100ml de Méthanol. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 25µl de méthanol avec 2.5 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517nm après 30 min d'incubation et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Tous les essais ont été effectués en triple. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \left[\frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}}{\text{Abs contrôle}} \right] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai)

Abs test : absorbance d'extrait.

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

II.2.1.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC50%

La valeur IC50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constitué de méthanol et de DPPH. Les valeurs IC50 ont été calculées par la régression linéaire où l'abscisse est représenté par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (I%). (Mensor et al., 2001).

II.2.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

- **Principe**

Ce test est basé sur la capacité de l'antioxydant présent dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe^{3+} ($FeCl_3$) en fer ferreux Fe^{2+} ($FeCl_2$) en présence d'un agent chromogène le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$. L'intensité du complexe de couleur vert, avec un maximum d'absorbance à 700 nm, est proportionnelle à la concentration en antioxydant (Oyaizu et al., 1986 cité par Amaroweiz et al., 2004).

II.2.2.1. Matériel et réactif

Les différents appareils et réactifs utilisés sont résumés dans le Tableau 09.

Tableau 09 : Liste d'appareils et réactifs utilisé dans le test du FRAP

<i>Appareil</i>	<i>Verrerie et Autres</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Solvant et Solutés</i>
Spectrophotométrie UV-VISIBLE 1700 (Pharma S pec SHIMADZU)	Eprouvette 10 ml	Tampon phosphate de PH 6,6 : H_3PO_4 et NAOH	Méthanol
	Fiolle jaugée 50ml100ml-250ml		Eau distillé
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Bécher de 50 ml	Ferricyanure de potassium [$K_3 Fe(CN)_6$] à 1%	
	Verre de montre		
Balance de précision (ALS286 4N)	Tube à hémolyse de 05 ml avec un portoir	Acide trichloracétique à 10%	
Centrifugeuse	Les embouts bleus et jaunes	Chlorure ferrique [$FeCl_3(H_2O)_6$] à 0.1%	
Bain-marie	Papier aluminium	Acide Ascorbique	
		Extrait de retama	

II.2.2.2. Mode d'opérateur

Selon Oyaizu (1986) un 0,5 ml de l'extrait à différentes concentrations (200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml et 1000 μ g/ml) dilué dans méthanolest mélangé avec) 1,25 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 1.25ml d'une solution de ferricyanure de

Partie pratique

potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min laisser les refroidissent après ajouté 2.5ml d'acide trichloroacétique à 10% pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi 1965).

II.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

II.3.1. Matériels et produits

L'ensemble des matériels et produits utilisés pour réaliser cette étude sont résumé dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Matériels et produit utilisés

Appareil	Verreries et Autres	Réactifs et Autres	Solvants et Solutés
Balance de précision (ALS 286 4N)	Tube à vis 16×160 mm et portoir	Milieu solide Muller-Hinton	Eau physiologique stérile
Micropipette de 10- 100µl	Erlenmeyer 1000ml	Milieu solide Sabouraud	Eau distillée
Plaque chauffante/agitateur magnétique (IKA RH basic 2)	Deux flacons de 200 ml	Extrait methanolique des feuilles de <i>Retama Sphaerocarpa</i>	Éthanol
	Spatule		Eau de javel
Étuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD)	Papier aluminium		Methanol
Étuve (Heraeus type 5042)	Anse platine		
Autoclavage	Pipette pasteur		
Bec benzène	Écouvillon stérile		
	Boites pétri		
	Disques stériles/Pince		
	Embouts jaunes		

II.3.2. Mode opératoire

Pour l'évaluation de l'activité biologique de notre extrait de *Rétama sphaerocarpa*, nous avons adopté la méthode de diffusion sur disque :

C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé spécifique (MH, Sabouraud). Cette technique va nous permet de détecter la présence d'une substance inhibitrice, indiqué par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion du composé antimicrobien ou antifongique. Alors que partout ailleurs, le développement des microorganismes est visible (Figure 27 a, b) (Meddour et al., 2013).

II.3.2.1. Souches testées

Dans notre travail, nous avons utilisé les souches indiquées dans le tableau 11 octroyées du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Tébessa.

Tableau 11 : Souches bactériennes et fongique utilisées.

	Classification	Souches	Références
Souches bactériennes	Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
		<i>Micrococcus luteus</i>	DSM1790
	Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
Souches fongiques	champignons	<i>Candida albicans</i> L24	Isolate Clinique
		<i>Candida albicans</i> L 36	Isolate Clinique

II.3.3. Protocole expérimental

Nous avons travaillé selon les étapes décrites ci-dessous .



Figure 19 : méthode de diffusion sur disque (milieu gélosé)

II.3.3.1. Milieu de culture

Pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes et fongique traitées notre EM-Rs nous avons utilisé :

- Milieu Muller-Hinton pour l'étude de l'activité antibactérienne.
- Milieu Sabouraud pour étude de l'activité antifongique.

Les compositions et les étapes de la préparation de nos milieux de culture sont données en tableau 12 :

Tableau 12 : Protocole de préparations des Milieux de culture utilisées

Milieux de culture	MH	Sabouraud
Ingrédients	15,2 g MH en poudre + 400 ml d'eau distillée	36,6 g sabouraud en poudr+600 ml d'eau distillée
Technique de préparation	<ul style="list-style-type: none">➤ Le mélange poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min (afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux)➤ Ensuite les milieux préparés sont reparti dans des flacons stériles, avant d'être Autoclavé pendant 20 min à 120°C.	

II.3.3.2. Préparation des boîtes de pétri

Pour préparer les boîtes de pétrie il faut :

- Ramener la gélose à une température de 42-45°C avant l'utilisée (MH ou Sabouraud).
- La gélose prête est coulée dans des boîtes de pétri stériles.
- L'épaisseur de la gélose est de 4mm uniformément pour tous les boîtes ; ces dernières doivent être bien séchées près du bec benzène avant leur utilisation.

II.3.3.3. Préparation des suspensions

À partir d'une culture sur milieu de repiquage, racler à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies (3-5) bien isolées et parfaitement semblables.

On Décharge ces colonies une par une à l'aide d'une anse de platine stérile dans des tubes contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

On homogénéise la suspension de façon à obtenir visiblement une opacité équivalente à 0.5 Mac Ferland. La suspension doit êtreensemencé dans les 15 min qui suivent sa préparation. En refait cette étape pour toutes les bactéries et les champignons du test .

II.3.3.4. Ensemencement

L'ensemencement se fait d'après la méthode de Kirby-Bauer (2004), par écouvillonnage.

- Après l'immersion d'un écouvillon stérile dans notre suspension (figure 29), en doit essorer l'écouvillon doucement sur la paroi du tube.
- Chaque milieu de culture préalablement préparés, doit être ensemencés par étalement, à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension (bactérie/champignons) déjà préparée une par une.
- L'opération est répétée 3 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et de passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose
- L'ensemencement s'effectue de t'elle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries et champignons sur les milieux.



Figure 20: a : suspension bactérienne préparer. b: ensemencement

II.3.3.5. Préparation des disques et l'ajoute d'EM-Rs

- Stérilisation des disques de papier wattman de 6mm de diamètre, à 120°C pendant 20 min par autoclavage.
- Sur chaque boîte de pétri ensemencée, on dispose à l'aide d'un pince 3 disques dont leur contact avec la surface doit être étroit.
- En ajoute avec une micropipette 15 μ l d'extrait méthanolique de EM-Rs boiss à une concentration 1000 μ g/ml (figure 21)
- Ensuite les boîtes de pétrie doivent rester à côté du bec benzène pour quelque seconde pour assurer une bonne diffusion des EM-Rs testés dans les milieux ensemencés.

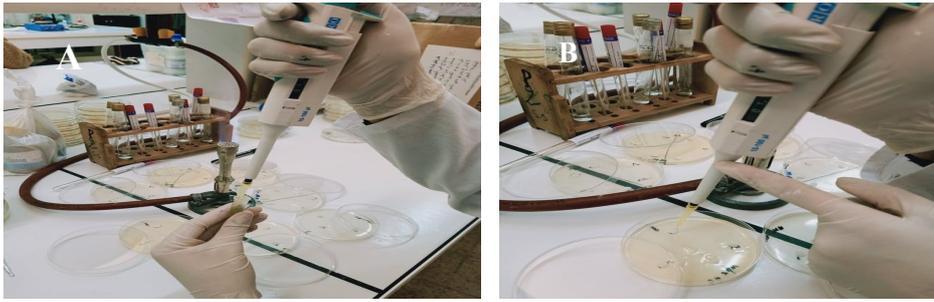


Figure 21 : application de EM-Rs sur les disques

II.3.3.6. Incubation

L'incubation se fait pendant 24 à 48 h dans une étuve réglée préalablement à une température 37°C (*E. coli* / *Candida albicans* L24, *Candida albicans* L36) et 30°C (*Micrococcus luteus*).

II.3.3.7. Lectures

Les activités biologiques (antimicrobiennes, antifongiques) sont déterminées en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition, qui sont apparues autour chaque disque. A l'aide d'une règle et sur un fond sombre. Les résultats représentent la moyenne des 3 lectures

Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour de chaque disque dont le diamètre est supérieur à 8 mm, les résultats expérimentaux sont représentés dans le Tableau 13. Tous les essais, aussi bien fongiques que bactériens, ont été répétés trois fois.

Tableau 13 : Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre du halo d'inhibition
(Duraffourd et Lapraz, 2002)

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X \leq 8$ mm	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14$ mm	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20$ mm	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20$ mm	Très sensible	+++

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extrait de méthanolique *Retama sphaerocarpa*

Le rendement de la matière végétale en extrait méthanolique obtenu dans cette étude était de 34.17%. Cette teneur paraît plus élevée comparée à celle rapportée par **Benzohra *et al.*, (2019)** qui ont trouvé un rendement de 32,5% en utilisant une masse végétale de 20g. Un rendement plus faible de l'EM-Rs de l'ordre de 15,86%. a été obtenu par **BOUSSAHEL (2011)**. Ces différences entre les résultats peuvent être expliquées par le fait que les rendements des extraits de *Retama* sont influencés par plusieurs facteurs lors de leur extraction : soit des facteurs qui concernent la plante (espèce, variété, race chimique, etc.) soit des facteurs liés aux conditions expérimentales (procédé d'extraction, durée d'extraction, etc.) soit par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'extrait. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante utilisée, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée... etc. sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en extraits (**Kelen et Tepe, 2008**)

III.2. Activité antioxydante de l'extrait de *Raetama sphaerocarpa*

III.2.1. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été examiné pour chaque concentration de l'EM-Rs et de la vitamine C est présenté dans la Figure.22

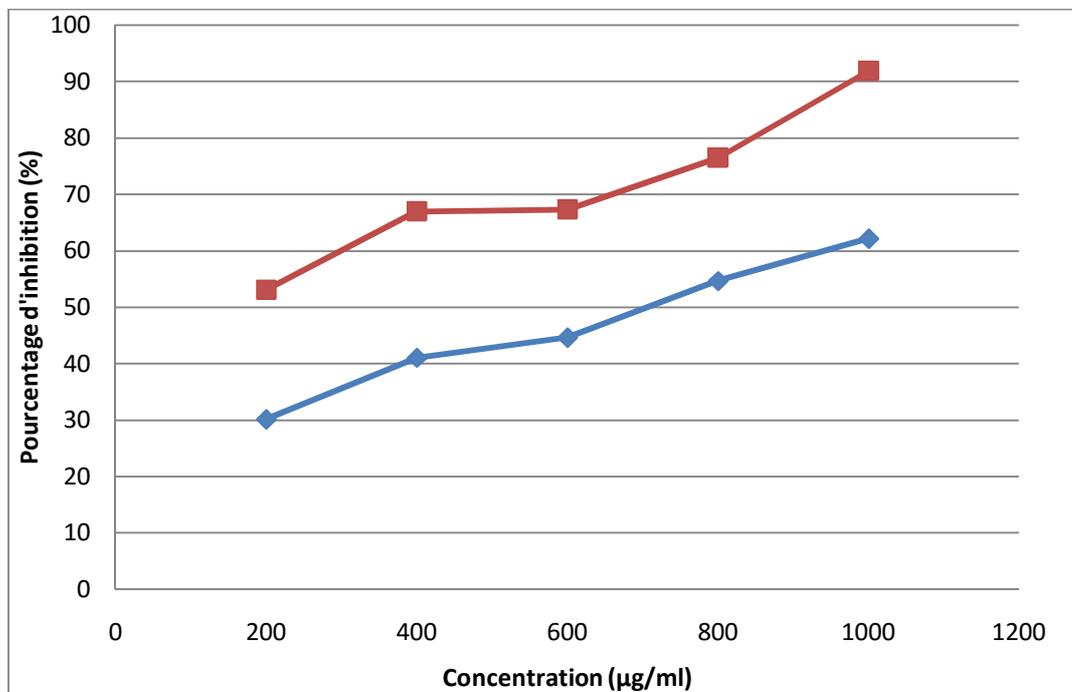


Figure 22. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de *Raetama sphaerocarpa* et vit.C.

Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation des concentrations qu'elle soit pour l'EM-Rs ou pour la vit.C. On observe que pour la dose de 1000 µg/ml, le pourcentage d'inhibition du radical libre pour *R. sphaerocarpa* est inférieur à celui de la vitamine C (90,86% vs 62,19%) et pour la dose de 200 µg/ml le pourcentage d'inhibition de *R. sphaerocarpa* est de 30,18% alors qu'il est de 51,97% pour la vit.C.

Nos valeurs de pourcentage d'inhibition de l'EM-Rs paraissent supérieures à celles rapportées par Saadaoui *et al.*, (2006). En effets, ces auteurs rapportent une valeur de pourcentage d'inhibition de seulement 10,38% pour l'EM des feuilles *R. raetam* même en utilisant une concentration supérieure à la nôtre (1660 µg/ml).

Nos valeurs de pourcentage d'inhibition de l'EM-Rs paraissent inférieures à celles rapportées par Akila *et al.* (2016). En effet, ces auteurs rapportent une valeur de pourcentage d'inhibition de 76% pour l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles *R. raetam* même en utilisant une concentration inférieures à la nôtre (100 µg/ml).

III.2.2. Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%)

À des fins comparatives, nous avons évalué l'IC50 des deux composés (EM-Rs et vit.C). Cet indicateur exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• à la moitié (50%). L'IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé. Cela veut dire que la capacité antioxydant d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite. Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire comme c'est illustré dans la Figure 23.

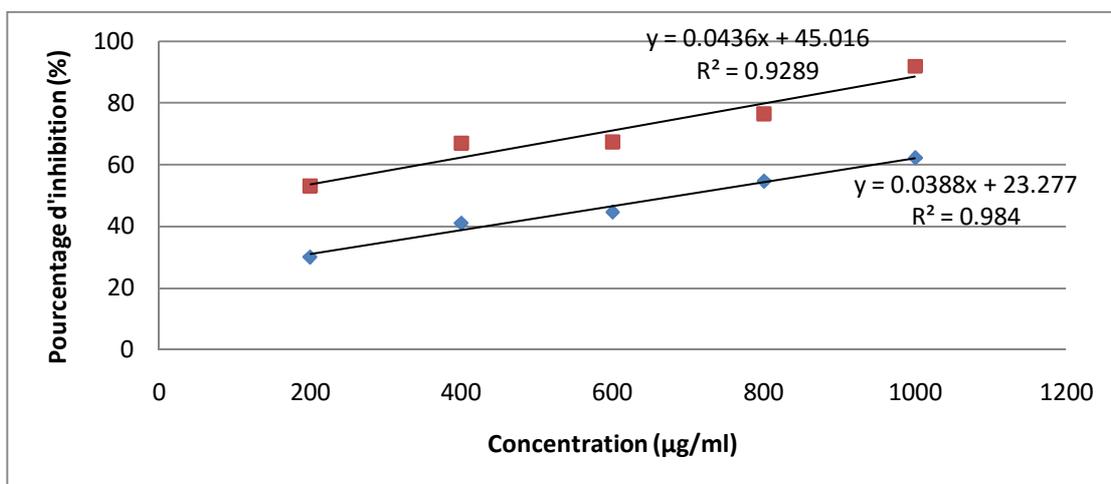


Figure 23: Détermination de la valeur IC50 de la vitamine C (a) et de l'extrait de *Raetama sphaerocarpa* (b).

Concernant la vit.C, l'IC50 est de 141,31 $\mu\text{g/ml}$ qui montrent un pouvoir antioxydant très largement supérieur à celui de l'EM-Rs qui marque une valeur d'IC50 de 688,74 $\mu\text{g/ml}$. D'après ces résultats on prouve que l'acide ascorbique reste l'antioxydant le plus efficace par rapport à notre extrait de *Raetama sphaerocarpa*.

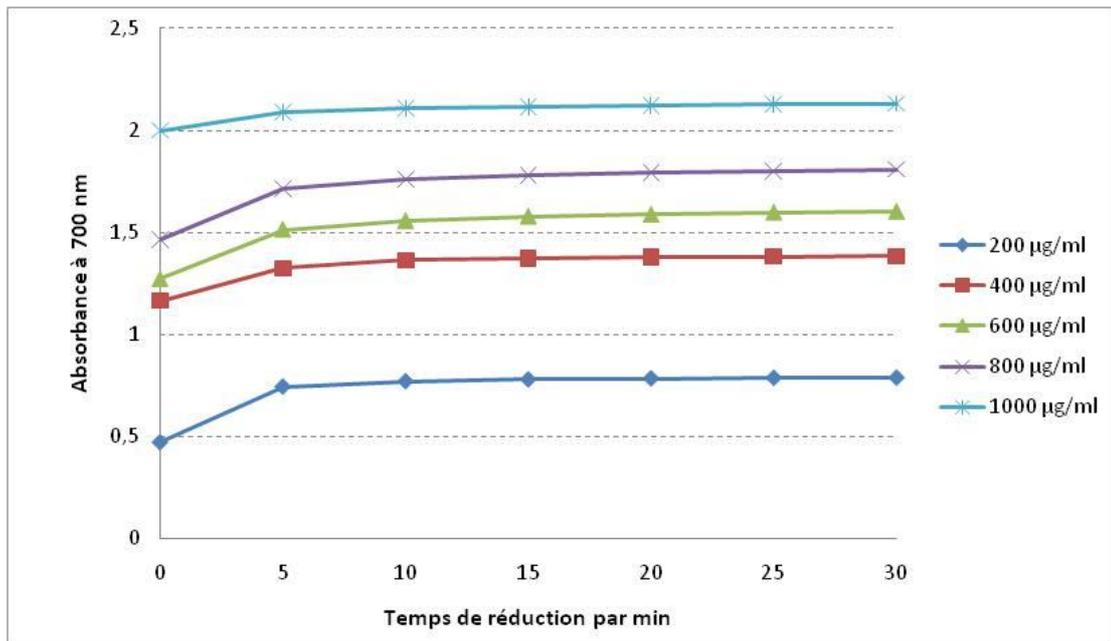
Nos valeurs de de IC50 l'EM-Rs paraissent supérieures à celles rapportées par **Edziri et al. (2008)**. En effet, ces auteurs rapportent une valeur de l'IC50 de 500 $\mu\text{g/ml}$ pour l'EM-Rs, dans même concentration à la nôtre (1000 $\mu\text{g/ml}$). En revanche, nos valeurs de de IC50 l'EM-Rs paraissent inférieures à celles rapportées par **Soulef (2010)**. En effet, cet auteur rapporte une valeur de l'IC50 de 460 $\mu\text{g/ml}$ pour l'EM-Rs à la concentration (100 $\mu\text{g/ml}$)

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène Les polyphénols contenus dans les extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits. (**Pooter et Schamp, 1986**).

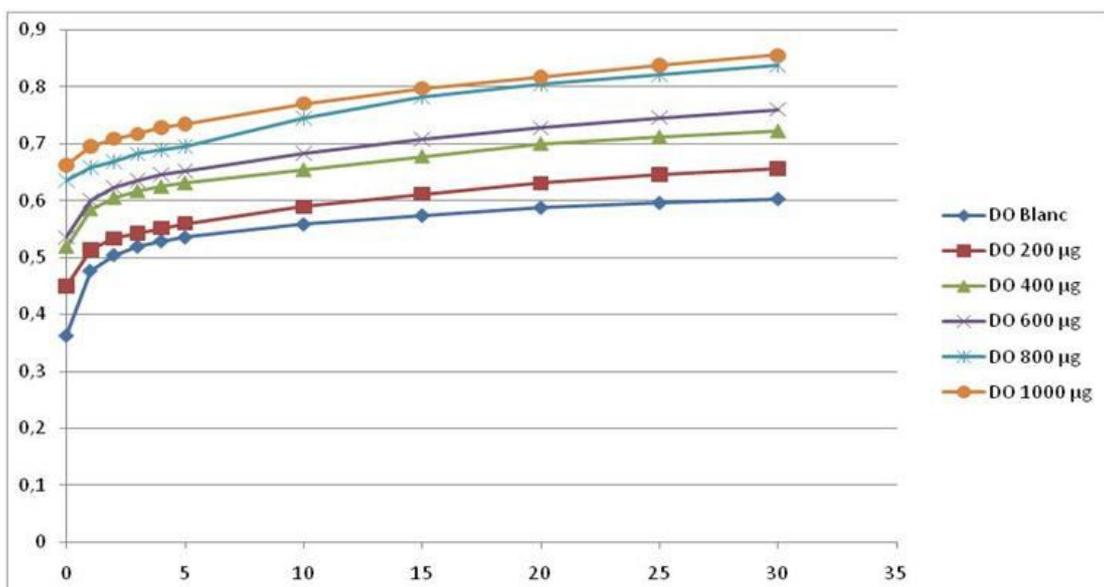
III.2.3. Etude cinétique de la réaction par le test de réduction du fer (FRAP)

Les valeurs obtenues de notre extrait *Raetama sphaerocarpa*. et de vit C ont permis de tracer des courbes présentées dans la Figure 24. D'une manière générale, les absorbances enregistrées pour extrait et la Vit.C augmentent en fonction du temps. Quelle que soit la concentration utilisée, la réaction entre le fer ferrique et l'acide ascorbique (donneurs d'électron) atteint son maximum rapidement après 5 min. Ensuite l'évolution reconnaît une allure stationnaire jusqu'à 30 min. En ce qui concerne l'EM-Rs., on observe une augmentation continue jusqu'à 30 min. On observe également que l'intensité de la réaction est dose-dépendante pour la vit.C et pour l'EM-Rs. En effet, les valeurs de l'absorbances augmentent avec l'augmentation de la dose utilisée. Par exemple, après 30 min de réaction avec la Vit.C, l'absorbance enregistrée pour la dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ est de 0,786 nm alors qu'elle est de 2,131 nm pour la dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'EM-Rs, l'absorbance enregistrée après 30 min pour la dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ est de 0,655 nm alors qu'elle est de 0.855 nm pour la dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Nos résultats montrent que les valeurs d'absorbance enregistrées pour la Vit.C sont beaucoup plus élevées que celles enregistrées pour l'extrait et ce quelle que soit la dose utilisée et le temps de réaction écoulé. Par exemple, pour la dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ et après 30 min de réaction, l'absorbance enregistrée pour la vit.C est de 2,131 nm et de 0,855 nm pour notre extrait. Ces résultats soulignent que le pouvoir antioxydant de la vit.C est beaucoup plus intense que celui de l'EM-Rs.



(a) Acide ascorbique (vitamine C)



(b) extrait de *Raetama sphaerocarpa*

Figure 24. Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et extrait de *Raetama sphaerocarpa* avec le temps

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Chekalaine et Meraikin (2016)** qui enregistrent une absorbance de 637 nm pour l'extrait acétonique de fleurs de *Retama retama* à une concentration de 833 µg/ml. En utilisant l'extrait n-butanol des tiges et de *Retama retama*, Il ont trouvé une absorbance de 0,984 nm a la même concentration (833 µg/ml).

Le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju .et**

Becker, 2007). L'effet antioxydant d'un extrait peut différer selon la qualité des polyphénols y présents tel les flavonoïdes qui ont montrés des activités antioxydantes (Wang et Mazza, 2002).

III.3. Activité antimicrobienne de EM-RS

Face aux problèmes de la résistance antimicrobienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels tels que les extraits de certaines plantes (Aouadhi, 2013). Notre recherche est une contribution à l'étude biochimique des plantes poussant en Algérie, dans le but de découvrir des produits naturels ayant une activité biologique potentielle.(Louaar, 2007)

Lors de cette étude, le pouvoir antimicrobien de l'extrait méthanolique des feuilles de *retama sphaerocarpa* récoltées à Tébessa , a été étudié vis-à-vis trois souches bactériennes et deux souches fongiques ,par la méthode de diffusion sur disques en milieux gélosés (MH et Sabouraud). Ce pouvoir a été évalué par la détermination du diamètre de zone d'inhibition (Tableau 14),

Tableau 14 : Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) d'extrait méthanolique des feuilles de *Retama Sphaerocarpa* contre certaines souches microbiennes.

Souches testées		Moyenne* de diamètre D'inhibition± Ecartype (mm)
Bactérie	<i>S. Aureus</i>	19.33±0.66
	<i>E. Coli</i>	13.67±2,30
	<i>Micrococus</i>	19.67±1.20
Champignons	<i>Candida Albicans L24</i>	18.10±1,26
	<i>Candida Albicans L 36</i>	21.10±0.57

*Les valeurs données sont les moyennes des trois répétitions indépendantes

D'une manière globale, la plupart des souches testées paraissent sensible à l'EM-Rs (diamètre d'inhibition > 14mm). D'après le tableau**, nous constatons que l'effet antimicrobien de l'EM-Rs varie selon les souches microbiennes. La souche la plus sensible à l'EM-Rs est *Candida Albicans L 36* quia marqué lediamètre d'inhibitions maximal (21 mm). En revanche *E. coli* paraît moins sensible que les autres souches (13,67 mm).

III.3.1. Activité antibactérienne d'EM-Rs

Nous observant que notre extrait présente une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des 03 souches bactériennes testées (Figure 01) avec des diamètres d'inhibition allant de 13,67 mm pour *E. coli* à 19,67 mm pour *M. luteus*. La zone d'inhibition enregistrée pour *S. aureus* est de 19,33 mm. Nos résultats permettent de constater que l'EM-Rs paraît plus efficace pour les bactéries gram + que pour les bactéries Gram-.

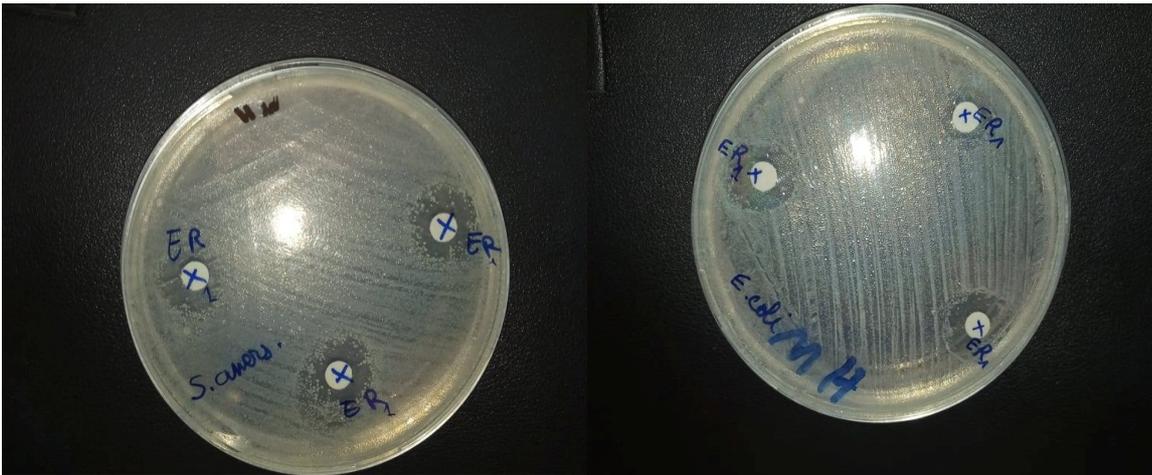


Figure 25 : Résultat des tests antibactériens de l'EM-Rs vis-à-vis des bactéries : (A) *S. aureus* et (B) *E. coli*

Ces résultats laissent apparaître des activités antibactériennes variables en fonction de la souche cible. Dont La plus grande zone d'inhibition est observée pour les Micrococcus (19.67mm), suivie par celle du Staphylococcus aureus (19.33mm) et en fin la souche bactérienne *E. Coli* (Gram -) se révèle la moins sensible pour notre EM-Rs, avec un diamètre d'inhibitions de (13.67mm)

Les propriétés antimicrobiennes des différents extraits de la plante *Rétama Raetam* et *Rétama Monosperma* sont connues (**Onawumi et al., 1984 ; Chaumont et al., 2001 et Koba et al., 2003**) Alors que d'autres études ont examiné quelques activités biologiques des extraits obtenus par les grains, fleurs et racines des 3 types de rétamas (*monosperma*, *reatam* et *Sphaerocarpa*) tels que **S. Louaar (2007)** dans la région de Sétif, **Djeddi (2012)** à Tlemcen, **Zuhair (2014)** à Laghouat. Toutes ces recherches comprennent l'utilisation de nombreux solvants et diverses techniques d'extraction.

Mais en particulier, nous n'avons pas trouvé des études similaires à notre travail. Par conséquent, notre étude peut être considérée comme le premier rapport sur les propriétés antimicrobiennes des extraits méthanoliques préparés à partir de feuilles de *Retama sphaerocarpa* in vitro.

L'effet des EM-RS sur le germe *Staphylococcus aureus* obtenus dans notre cas est en parfaite concordance avec les travaux antérieurs réalisés par (**Louaer et al., 2007**) à partir de l'extrait N-Butanolique des parties aériennes de retama *Sphaerocarpa*. Avec une zone d'inhibition 20 mm en utilisant une concentration (1000 µg / ml).

Hammouche et al.,(2017), ont étudié l'activité antibactériennes des extraits aqueux des feuilles de *Retama Raetam* et *Retama Sphaerocarpa* , sur plusieurs souches bactériennes Gram+ et Gram- en utilisant la méthode de diffusion sur gélose . Les deux espèces de *Retama* ont montré une activité plus importante contre *Staphylococcus aureus* (gram+) avec des zones d'inhibition de 15.2 mm et 16.7 mm par rapport au celle de *E. Coli* (gram-) avec des zones d'inhibition 10.3 mm et 11.7 mm respectivement. En vue générale, Ces résultats semblent cohérents avec nos résultats. Cependant, ces auteurs rapportent des valeurs des zones d'inhibition légèrement inférieures à nos valeurs même en utilisant une concentration 20 fois supérieure à la nôtre 10 µL (20 000 µg / ml).

En outre , nos résultats confirment le travail de **Saouhel et al.,(2014)** qui ont prouvé via l'utilisation de la méthode de diffusion sur disque, une activité antibactérienne considérable pour l'extrait d'acétate d'éthyle de retama raetam contre plusieurs souches pathogènes humains notamment ; *E. coli* (gram-) , avec un diamètre de zone d'inhibition égal à 12 mm et un CIM 1380 µg/ml , pour une concentration inférieure à la notre (300 µg/ml).

La raison de la sensibilité plus élevée chez les bactéries Gram + par rapport aux bactéries Gram - pourrait s'expliquer par les différences entre les structures de leur paroi cellulaire, Car les bactéries Gram-positives contiennent une couche externe de peptidoglycane, qui est une barrière de perméabilité inefficace (**Scherrer et Gerhardt, 1971**) tandis que les Gram-négatifs ont des lipopolysaccharides dans leurs membranes externes, ce qui les rend intrinsèquement résistantes aux antibiotiques, aux détergents et aux extraits organiques (**Nikaido et al., 1985**)

L'activité antibactérienne des EM-Rs étudiés est principalement due à leur composition en substances actives tels que les polyphénols, notamment les tannins (**Shan et al., 2007**). Grâce à leurs groupes hydroxyles, ont une capacité de se lier aux protéines des membranes bactériennes pour former des complexes (**Zongo et al., 2011**).

Shan et al., (2016) montre que les polyphénols (les tannins et les flavonoïdes) isolés pour la première fois par **laouaar en (2014)** tel que apigenin 8-C-glucoside (vitexin) , (vicenin-2) et (quercitrin) , Ont démontré un pouvoir inhibiteur très élevé contre plusieurs microorganismes et alors qui sont substances antibactériennes et antifongique importantes (**Mohsen & Ammar, 2016**). Plusieurs recherches démontrent que les alcaloïdes contenus dans l'extrait de retama *Sphaerocarpa*, ont également une activité antimicrobienne significative (**Dixon et Paiva, 1995**)

Aouadhi, (2013) a montré que Les composés antimicrobiens des plantes peuvent inhiber la croissance bactérienne par différents mécanismes. En effet, Caillet et Lacroix (2007) ont montré que l'action antimicrobienne des extraits des plantes médicinales se déroule en trois phases:

1. Attaque de la paroi bactérienne par les extraits, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
2. Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
3. Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie. Les antimicrobiens peuvent donc avoir une valeur clinique importante dans le traitement des souches microbiennes résistantes

III.3.2. Activités antifongiques d'EM-Rs

Les résultats montrent que l'activité antifongique de l'EM-Rs varie en fonction des souches testées. En effet, nous avons enregistré une activité plus intense vis-à-vis de la souche L36 avec un diamètre d'inhibition de 21,00mm contre un diamètre d'inhibition de seulement 18,11 mm contre la souche L24 (figure 26).



Figure 26 : Résultat des tests antifongiques de l'EM-Rs vis-à-vis des levures: *Candida albicans* L24 /L36.

Notamment en littérature, L'importance des extraits de la plante *Retama raetam* contre plusieurs agents pathogènes a été rapportée ces dernières années par **Edziri et al., (2010 ; 2012)** qui ont trouvé des diamètres d'inhibition de 19,5 mm et 16,8 mm pour les *Candidas albicans* en fonction des deux extraits utilisés de *Retama raetam* (éthanolique et butanolique) respectivement et en utilisant des concentrations identiques à la nôtre (1000 µg/ml). **Belabid et al. (2010)** ont rapporté des résultats similaires contre d'autres espèces fongiques pathogènes par l'utilisation de l'extrait méthanolique des racines et fleurs de *Retama monosperme* avec une concentration légèrement inférieure à la nôtre (800 µg/ml). De même, **(Al-Rahmah et al., 2013 et Béné et al., 2016)** ont conclu lors de son travail que tous les extraits n-butanolique du *Retama monosperme* utilisés, ont un effet exceptionnel sur les deux souches fongiques testées (*C.albicans*) avec des diamètres

d'inhibitions de 18,10 mm et 19,8 mm pour 800 $\mu\text{g/ml}$ et 1000 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, par rapport à celles de l'antifongique référentielle utilisé qui a marqué des diamètres d'inhibitions de 15,30 mm et 19,30 mm avec les mêmes concentrations respectivement.

Ces résultats paraissent différents de ceux obtenus par (**Mastouri et al., 2008**). En effet ces auteurs rapportent que Tous les différents extraits des fleurs de *R. Raetam* récoltée en Tunisie ont montré une activité antifongique modérée contre l'espèce *Candida albicans* (CMI > 2g/ml) . Même en utilisant une concentration très supérieure à la nôtre (2000 $\mu\text{g/ml}$).

De même dans une étude récente concernant les activités antifongiques des alcaloïdes des parties aériennes de *R. monosperma*, **Fdil et al., (2016)** ont révélé que les extraits dichlorométhane obtenus des graines et des fleurs de la plante n'ont aucun effet antifongique. Cette même étude révèle des diamètres d'inhibition de 16.66 mm Et 18.66 mm respectivement, pour les extraits obtenus à partir des tiges et des feuilles de *R. monosperma*, ce qui signifie que seuls les extraits des tiges et des feuilles de *R. monosperma*, ont une action contre les différentes souches de *Candida albicans* testés. Ces dernières valeurs confirment nos résultats même en utilisant une concentration inférieure à la nôtre (500 $\mu\text{g/ml}$). Les résultats de (**Ertürk, 2006**), ont démontré aussi une zone d'inhibition très faible de (14 mm) pour l'extrait éthanolique du *Retama monosperma* vis-à-vis la levure *Candida albicans*. Ce qui indique que l'activité antifongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction, ainsi que du genre du *Retama* utilisé

D'une façon générale, plusieurs auteurs comme (**Bouterfas et al., 2016**) ont suggéré que l'activité antifongique de certaines plantes telles les *Retamas* varie significativement en fonction de la localité d'échantillonnage, de type d'extrait testé ainsi que de sa concentration, aussi bien selon la souche fongique étudiée. Le pouvoir antifongique mis en évidence pourrait être expliqué par les métabolites secondaires que contiennent ces plantes tels que les polyphénols et les flavonoïdes . (**Hadji et al., 2016**). C'est pour cela, la comparaison de l'efficacité des différents extraits de *Retamas* à travers les différentes publications reste difficile à réaliser. **Cowan (1999)** a rapporté que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers des diverses souches fongiques pathogènes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de la recherche des activités biologiques de l'extrait méthanolique des feuilles du *Raetama sphaerocarpa* nous avons évalué leurs activités antioxydantes et activités antimicrobiennes. Au terme de cette étude, nous avons pu conclure que :

- le rendement de l'extraction de cette plante par le méthanol en matière sèche est assez remarquable (34.17%).
- Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le pouvoir antioxydant de l'EM-Rs est remarquable comparé à la Vit C était qui représente l'antioxydant de choix. Le test de DPPH, a permis de conclure que le pourcentage d'inhibition du radical libre de DPPH pour la vit C est supérieur à celui l'EM-Rs (62,19% vs 90,86%) dans 1000µg/ml. La CI_{50} de l'EM-Rs s'avérait supérieure à celle de la vit C (688,74 µg/ml vs 114,31 µg/ml respectivement). Le test de réduction du fer FRAP confirme ces résultats. En effet, l'absorbance enregistré pour la vit C était de 2,131 nm et alors que celle de l'EMG était de 0,855 nm.
- L'activité antibactérienne montre que l'EM-Rs manifeste un grand effet contre les 03 souches bactériennes testées. (*S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*.) avec des diamètres d'inhibition (19,33mm / 13,67mm / 19,67mm) respectivement.
- L'activité antifongique du l' EM-Rs manifeste également un effet remarquable chez les 02 souches fongiques testées (*C.albicans* L24, *C.albicans* L24), Avec des diamètres d'inhibition (18,11mm / 21,00mm) respectivement.

Les résultats de notre travail ne constituent qu'une première étape de la recherche d'un remède naturel ayant des propriétés antioxydante et antimicrobienne. Nos résultats peuvent trouver des applications dans les domaines en relation avec le traitement des infections microbiennes notamment.

En perspective, il serait important d'approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes et d'identifier les constituants actifs responsables de ces activités antibactériennes et antifongiques., Ainsi que leur mode d'action.

**Liste des
références
bibliographiques**

Liste des références bibliographiques

Liste des références bibliographiques

(A)

Alscher, R.G., Erturk, N et Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341.

Amarowicz, R. Pegg, R.B., Pahimi-Moghaddme, P., Barl, B. et Weil, J.A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84: 551-562.

Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. et Hochstein, P. (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11): 6858-6862.

Amié, D., Davidovié-Amié, D., Bešlo, D. et Trinajstić, N. (2003). Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemical acta*, 76(1): 55-61.

Anjum, N.A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A.C., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N.A et Iqbal, M. (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environ. Exp. Bot.* 75, 307–324.

Arora, A., Sairam, R.K et Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.-Bangalore-* 82, 1227–1238.

(B)

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences*, 22, 266-72.

Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, 2 (1), 43-52.

Benaissa. A., Cherfia. R. , Canabady. L., Perrin. D., Chaimbault. P., Bouhelassa. M et Kacem. N. (2016).Antioxydant and Antimicrobial Potentials of Retama Sphaerocarpa. Page No. 214 ISSN: 0975-8585.

Bentinger, M., Tekle, M. et Dallner, G. (2010). "Coenzyme Q--biosynthesis and functions." *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 74-79.

Benzohra.I ., Megateli. M, Belaidi. H et Toumi. F. (2019). Activité antifongique de l'extrait méthanolique de R'tem (Retama raetam) sur la croissance mycélienne et la sporulation de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de Bayoud du Palmier dattier. *Journal Algérien des Régions*

Liste des références bibliographiques

Arides (JARA) 13 (2). e-ISSN: 2676-2226, Published by: Scientific and Technical Research Centre for Arid Areas (CRSTRA).

Blanc M., Moinard C. et Cynober L. (2005) "Monoxyde d'azote." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier, pp: 25-43.

Blois. M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199 – 1200.

Bloomer. RJ et Fisher-Wellman. KH. (2008). Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine*, 2008; 5: 218-228.

Boussahel.S (2010). Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Mémoire de Magister.

Brand-Williams. W., Cuvelier M.E. et Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technology*, 28, 25–30.

Browne. RW., Bloom MS., Schisterman. EF., Hovey. K., Trevisan. M., Wu. C, Liu. A et Wactawski-Wende. J. (2008). Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*,; 13: 160-183.

(C)

Chekalaine .C et Meraikin. N, (2016). Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des polyphénols et des flavonoïdes issues de plante médicinale *Rétama Raetam*. Thèse 2016-2017.

Chen L., HU J.Y. et Wang S.Q. (2012). The rôle of antioxydants in photoprotection: a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013-1024.

Cobbett, C et Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.

Comhair, S.A et Erzurum, S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* 283: L 246- L 255.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A et Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 122-131.

Liste des références bibliographiques

(D)

Davies MJ. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci*; 3: 17-25.

Deby-Dupont G., Deby C et Lamy M. (1999). Neutrophil myeloperoxidase: its role in health and disease. *Intensivmed.* 36, 500-13.

Delattre, J., Beaudoux, J.-L. et Bonnefont-Rousselot, D. (2007). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques.

Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C et Brenner, C. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability trans.

Desel, C., Hubbermann, E.M., Schwarz, K et Krupinska, K. (2007). Nitration of gamma-tocopherol in plant tissues. *Planta* 226, 1311–1322.

(E)

Edziri. H., Mastouri. M., Ammar S, Matieu. M., Patrich. G., Hiar. R., Mahjoub. M., Ali Si. M., Laurent. G., Zine. M et Aouni. M. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol.*:2933–2940.

Esposito,E., Rotinio,D., Matteo,V., Giu/io,C., Cacchio,M., et Ageri ,S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical/ mechanisms re/ated to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* 23: 719-735.

(F)

Fang,Y.l., Yang ,S et Wu,G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.

Favier,A. (2006). Oxidative stress in human diseases. *Ann.Pharm.Fr.* 64: 390-396.

Foyer, C.H., Harbinson, J et Mullineaux, P.M.(1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *Causes Photooxidative Stress Amelior. Def. Syst. Plants* 1–42.

Foyer, C.H et Noctor, G., (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28, 1056–1071.

Liste des références bibliographiques

Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J et Salt, D.E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi nickel* hyperaccumulators. *Plant Cell Online* 16, 2176–2191.

Fridovitch, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\circ-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272: 18515–18517.

(G)

Gardès-Albert M. et Jore D. (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: pp 1-23.

Gardès-Albert M. et Jore D. (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: pp 1-23.

Garg, N et Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosyst.* 143, 81–96.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3, 162–169.

Gibson A.M., Baranyi J., Pitt J.I., Eyles M.J. et Roberts T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Food Microbiology* 23 (1994) 419-431.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., et Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 959-975.

Gock M.A., Hocking A.D., Pitt J.I et Paulos P.G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi, *International Journal of Food Microbiology*, 81 : 11-19.

Goldsby R., Kindt T.J. et Osborne B.A. (2001) *Immunologie*, 4ème éd. Dunod, Paris

Grandjean, D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv Prat Vét* 22, 11-15.

Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. et Jozkowicz, A. (2012). "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology." *Clin Sci (Lond)* 122(3): 93-103.

Liste des références bibliographiques

Gulcin, I. (2012). "Antioxidant activity of food constituents: an overview." *Arch Toxicol* 86(3): 345-391.

(H)

Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol* 186: 1-85.

Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y. et Noguchi, M. (2004). "Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene." *Gene* 336(2): 241-250.

Hennebelle, T. (2006). "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*: 303.

Hong, J.H., Kim, M.J., Park, M.R., Kwag, O.G., Lee, I.S., Byun, B.H., Lee, S.C., Lee, K.B et Rhee, S.J. (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107-115.

Hu, J. (2007). Toward Understanding Plant Peroxisome Proliferation. *Plant Signal. Behav.* 2, 308–310.

Hulbert, A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277- 288.

(J)

Jean .F., Guy.L et Michéle.T. (2007). *Microbiologie générale et appliquée .delevrage.* Paris :saint-amand-Montrond.p285p.2-206-03328-3(2).

Jérôme.J., James.T et Stephen.L. (2004). *Microbiologie. États-Unis : Sinauer Associates.* 891p.2 10 007234x(1).

(K)

Kachour. L. (2005). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité, Mémoire de magister en microbiologie de l'environnement .université baji mokhtar Annaba.

Kelen.M et Tepe.B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4096–4104.

Liste des références bibliographiques

Kim, H.S., Kang, S.W., Rhee, S.G et Clerch, L.B. (2001). Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am. J. Physiol.* 280: 1212- 1217.

Koivula, M.J et Eeva, T.(2010). Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* 158, 2359–2370.

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346.

Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7, 617-635.

Kumari, M., Rajak, S., Singh, S.P., Murty, U.S., Mahboob, M., Grover, P et Rahman, M.F. (2013). Biochemical Alterations Induced by Acute Oral Doses of Iron Oxide Nanoparticles in Wistar Rats. *Drug Chem Toxicol Jul;36(3):296-305.* doi: 10.3109/01480545.2012.720988. Epub 2012 Oct 1.

Kumari. M., Rajak. S., Singh. S., Murty. U., Mahboob. M., Grover. P et Rahman. M. (2013). Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 36, 296-305.

(L)

Lambert J., Heath S., Even G., Campion D., Sleegers K., Hiltunen M et Combarros O. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41, 1094–1099.

Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 790-796.

Lillig, C. H.et Berndt, C. (2013). "Glutaredoxins in thioldisulfide exchange." *Antioxid Redox Signal* 18(13): 1654-1665.

Lillig, C., H., Berndt, C. et Holmgren, A. (2008). "Glutaredoxin systems." *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1304-1317.

Lind, C., Hochstein, P. et Ernster, L. (1982). "DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation." *Arch Biochem Biophys* 216(1): 178-185.

Lubec. G. (1996). The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of investigative medicine*, 44, 324-346.

Liste des références bibliographiques

Luis, A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A et Zilinskas, B.A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 54, 923–933.

Lyn Patrick, N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern Med Rev.* 11(2):114-127.

Lyoumi, S., Tamion, F., Leplingard, A., Beaumont, C., Puy, H. et Lebreton, J. P. (2007). "Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème." *Hématologie* 13(4): 251-265.

Lyubenova, L et Schröder, P. (2010). Uptake and effect of heavy metals on the plant detoxification cascade in the presence and absence of organic pollutants, in: *Soil Heavy Metals*. Springer, pp. 65–85.

(M)

Mac Laren, D. (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport.8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F.Elsevier.

Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin : Small Anim Practice.* f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants. Elsevier Inc. 38: 1-30

Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A.S., Richard, M.J et Favier, A. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise- induced response. *J Am Coll Nutr.* 22(2): 147-156.

Martínez-Cayuela. M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77, 147-161.

Mates, J.M., Perez-Gomez, Cet Nunez De Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and humain diseases. *Clin. Biochem.* 32 : 595-603.

McMichael, M.A. (2007). Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 231, 714-720. Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.

Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reine, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S et Leitão, S.G., (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy-tother.Res* 15, 127-130.

Liste des références bibliographiques

Migdal, C. et Serres, M. (2011). "[Reactive oxygen species and oxidative stress]." *Med Sci (Paris)* 27(4): 405-412.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.

Møller, I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 561–591.

Moreau C. (1996). les mycotoxines. In : Bourgeois C. M., Mescle J.-F., Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.* Ed. Tec & Doc. Paris, pp.176-185.

Mullineaux, P.M et Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynth. Res.* 86, 459–474.

(N)

Noctor, G et Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49, 249–279.

Noguchi, T. (2002). Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant Cell Physiol.* 43, 1112–1116.

(O)

Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition.* 44, 307–315.

(P)

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A et Barja, G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.

Peltier, J.-B., Ytterberg, A.J., Sun, Q et Wijk, K.J. (2004). New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279, 49367–49383.

Powers, S et Jackson, M. (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev* 88: 1243-1276.

Liste des références bibliographiques

Powers. SK., Smuder. AJ., Kavazis. AN et Hudson. MB. (2010). Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*; 20: 2-14.

Pritchard, J. B. et Miller, D. S. (1993). "Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations." *Physiol Rev* 73(4): 765-796.

(R)

Rao. C.V. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research*, 555, 107-119.

Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L. (2010). Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, *Revue française d'allergologie* 50 : 611–620.

Reboux. G. (2006). Mycotoxines : effet sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'allergologie et d'immunologie clinique* 46 (2006) 208 – 212.

Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C et Siedow, J.N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 141, 357–366.

Roede J.R. et Jones D.P. (2010). Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, 380-390.

(S)

Saadaoui.B, B.J , Akrouit.J., Ammar.S, Mahjoub.A et Mars.M. (2006). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien *Revue des Régions Arides - Numéro spécial - Actes du séminaire international « les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales »*.

Sertejn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-Mickalad A. et Deby-Dupont G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 147, 79-93.

Sertejn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M, Deby C. et Deby-Dupont G. (2002). La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 146, 137-53 .

Liste des références bibliographiques

Siegel, D. et Ross, D. (2000). "Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues." *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 246-253.

Siegel, D., Bolton, E. M., Burr, J. A., Liebler, D. C. et Ross, D. (1997). "The reduction of alphotocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alphotocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant." *Mol Pharmacol* 52(2): 300-305.

Siegel, D., Yan, C. et Ross, D. (2012). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones." *Biochem Pharmacol* 83(8): 1033- 1040.

Simic, M. G. et Jovanovic, S. V. (1989). "Antioxidation mechanisms of uric acid." *Journal of the American Chemical Society* 111(15): 5778-5782.

Singleton V.L.et Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*. 16, 144-153.

Stoyanovsky, D. A., Goldmana, R., Darrow, R. M., Organisciakb, D. T., Kagana. V. E. (1995). Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid. *Current Eye Research*.14 (3):181-189.

(T)

Turrens J.F., J. Physiol. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species, 552, 335-344.

(V)

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. et Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40

(W)

Wang, C. Y. and Chau, L. Y. (2010). "Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives." *Chang Gung Med J* 33(1): 13-24.

Wardman P. et Candeias L.P. (1996). Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research*, 145, 523-531.

Liste des références bibliographiques

Wiseman, H et Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1), 17-29.

Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J et Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 28: 32-40.

(Y)

Yadav, S.K., Dhote, M., Kumar, P., Sharma, J., Chakrabarti, T et Juwarkar, A.A. (2010). Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L. to chromium stress. *J. Hazard. Mater.* 180, 609–615.

Young, E.D., Galy, A et Nagahara, H. (2002). Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance.

Zhang, C.G., Leung, K.K., Wong, Y.S et Tam, N.F.Y. (2007). Germination, growth and physiological responses of mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* to lubricating oil pollution. *Environ. Exp. Bot.* 60, 127–136.

(Z)

Zhu, H., Zhang, L., Amin, A. R. et Li, Y. (2008). "Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress." *Exp Biol Med* (Maywood) 233(6): 753-765.

Zielinski, S et Portner, H.O. (2000). Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 125, 147- 160.